

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004485

International filing date: 15 March 2005 (15.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-074570
Filing date: 16 March 2004 (16.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 1 6 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 7 4 5 7 0

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 7 4 5 7 0
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 株式会社ディナベック研究所

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	D3-X0311
【特記事項】	特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願
【提出日】	平成16年 3月16日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 15/00
【発明者】	
【住所又は居所】	福岡県福岡市南区大池1-29-22
【氏名】	居石 克夫
【発明者】	
【住所又は居所】	福岡県福岡市東区名島5-31-3
【氏名】	米満 吉和
【発明者】	
【住所又は居所】	福岡県福岡市東区美和台5-1-25-101
【氏名】	鹿田 康紀
【発明者】	
【住所又は居所】	福岡県福岡市早良区小田部6-1-22-207
【氏名】	堤 敬文
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内
【氏名】	長谷川 護
【特許出願人】	
【識別番号】	595155107
【氏名又は名称】	株式会社ディナベック研究所
【代理人】	
【識別番号】	100102978
【弁理士】	
【氏名又は名称】	清水 初志
【選任した代理人】	
【識別番号】	100108774
【弁理士】	
【氏名又は名称】	橋本 一憲
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	041092
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1
【包括委任状番号】	9716812

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍の増殖を抑制する方法。

【請求項 2】

該工程が、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを腫瘍に投与する工程である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該分泌性蛋白質が可溶性PDGFR α である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

該工程が、PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、あるいは該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターを腫瘍に投与する工程である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

腫瘍が扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、および腺癌からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腫瘍増殖を抑制する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍増殖を抑制する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗血管新生薬による腫瘍増殖の低下を示す多くの動物実験により、腫瘍の拡大には血管新生を必要とすることが示されている (Folkman J., N Engl J Med 1971;285:1182-1186; Holmgren L. et al., Nat Med. 1995;1:149-153; Hlatky L et al., J Natl Cancer Inst. 2002;94:883-893)。血管内皮増殖因子 (VEGF) は腫瘍の血管新生の鍵となるメディエーターであり、可溶性の高親和性受容体である fms-like チロシンキナーゼ-1 (FLT-1) の過剰発現による VEGF 活性の阻害は、腫瘍の休眠を誘導する (Goldman CK et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1988;95:8795-8800; Kuo CJ et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:4605-4610)。これらの研究は、VEGF に関連するシグナル伝達が腫瘍の血管新生の標的となり得ることを示唆する。しかしながら、これらとは別の研究では、FLT-1 の抗腫瘍効果は、調べた各腫瘍型の VEGF 発現レベルに高度に依存していることが報告されており (Takayama K et al., Cancer Res. 2000;60:2169-2177)、抗 VEGF による治療戦略はごく限られたものになることが示唆される。従って広範囲に作用する抗腫瘍薬の開発にとって、各腫瘍型における血管新生増殖因子の発現プロファイルによらない、共通した腫瘍血管新生の分子標的を見つけ出すことが必要である。

【非特許文献1】 Folkman J., N Engl J Med 1971;285:1182-1186

【非特許文献2】 Holmgren L. et al., Nat Med. 1995;1:149-153

【非特許文献3】 Hlatky L et al., J Natl Cancer Inst. 2002;94:883-893

【非特許文献4】 Goldman CK et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1988;95:8795-8800

【非特許文献5】 Kuo CJ et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:4605-4610

【非特許文献6】 Takayama K et al., Cancer Res. 2000;60:2169-2177

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、腫瘍における血管系の形成および維持を阻害し、それにより腫瘍の増殖を抑制する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

最近の研究により開発された新たな免疫抑制薬であるラパマイシン (RAPA) は抗血管新生作用を持っており、腫瘍を縮退させることが示されている (Guba M et al., Nat Med. 2002;8:128-135)。臓器移植後の患者の免疫抑制治療は、腫瘍の発生および再発のリスクを増大させるが、RAPA の使用は、悪性腫瘍の発生の機会を減少させると考えられてきた。培養細胞のデータから、RAPA の抗血管新生効果は、腫瘍からの VEGF 発現の減少が関与することが示唆されているが、インビボにおける正確な作用機構は不明である。

【0005】

これとは別に、本発明者らは最近、重症肢虚血の治療のための線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) を用いた治療的血管新生において、内皮細胞 (endothelial cell; EC) ではなく間葉系細胞 (mesenchymal cell) における血管新生に関与するポリペプチドの発現が必須の役割を果たすことを実証している (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。FGF-2 は、血管系の間葉系細胞 (MCs; 周皮細胞 (pericyte)、血管平滑筋細胞、および外膜線維芽細胞 (adventitial fibroblasts) を含む) における VEGF および別の血管新生因子である肝細胞増殖因子/scatter 因子 (hepatocyte growth factor/scatter factor) (HGF/SF) の局所的発現を刺激する (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。興味深いことに、FGF-2 を介した HGF/SF 発現の

時間経過は二相的 (bi-phasic) で、初期のアップレギュレーションは新規の蛋白質合成を必要としないが、後期のアップレギュレーションは内在性の胎盤由来増殖因子受容体 α (platelet-derived growth factor receptor- α ; PDGFR α)-p70S6キナーゼ経路により媒介・維持される (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。

【0006】

腫瘍の拡大には、VEGFだけでなく宿主由来のFGF-2の活性が関わっている (Compagni A et al., Cancer Res. 2000;60:7163-7169) と予想され、またRAPAは TOR (target of rapamycin) の活性を低下させることを介したp70S6Kの特異的阻害剤であることから、本発明者らは、RAPAによる抗腫瘍効果は、宿主に由来するストローマMCにおけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路が関与しており、各々の腫瘍からの様々な血管新生シグナルには影響されないと予想した。

【0007】

実際、腫瘍フリーのアッセイ系 (すわなちマウスの肢虚血) を用いた実験の結果、本発明者らは、p70S6K阻害剤ラパマイシン (RAPA) が、間葉系細胞を標的として、PDGFR α -p70S6K経路のサイレンシングにより血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) および肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) の持続的発現を遮断することを証明した (実施例2)。また、腫瘍を用いた評価においては、調べた各腫瘍における血管新生因子の発現プロフィールが多様であることは無関係に、たとえ腫瘍でVEGFの発現が亢進している場合であっても、一定してRAPAは腫瘍を休眠 (dormancy) させ、時間経過と共に重度の虚血状態に導いた (実施例4)。RAPAは、培養系においては、低酸素 (hypoxia) に関連するVEGFの発現に対して最小限の影響しか示さないことから、これらの結果はRAPAはインビボにおいて、腫瘍そのものというよりも宿主の血管系 (host-vasculature) を標的としていることが示唆された。すなわち本発明は、PDGFR α -p70S6K経路は、FGF-2を介した治療的新血管形成に必須の調節ファクターであるのみならず、腫瘍の血管新生における宿主由来の血管系の必須の調節ファクターであり、複数の血管増殖因子の発現を制御していることを示した。このように本発明は、間葉系細胞におけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路は、悪性腫瘍の性質によらずに血管新生を阻害することができる、共通でユビキタスな分子標的となることを証明した。

【0008】

PDGFR α の生物学的役割は長い期間議論のあるものであった。PDGF-Aホモダイマー (PDGF-AA) はDNA合成を誘導しNIH3T3細胞の増殖も誘導する。しかし反対に、他の細胞では、他の試薬により誘導されたケモタキシス反応を阻害する (Siegbahn A et al., J Clin Invest. 1990;85:916-920)。PDGF受容体の内皮細胞における発現についてはほとんど証拠がないが、PDGF受容体リガンドは、PDGF-AAおよびPDGF-BBだけでなく、新規のPDGFであるPDGF-CC (Li X et al., Nat Cell Biol. 2000;2:302-309) もまた、インビボで血管新生を刺激する (Nicosia RF et al., Am J Pathol. 1994;145:1023-1029; Cao R et al., FASEB J. 2002;16:1575-1583)。これらのことは、他の血管新生の刺激因子もPDGF依存的血管新生の過程を媒介している可能性を示唆している。本発明は、以前の研究 (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730) と同様に、MCにおけるVEGFおよびHGF/SFを用いた血管新生シグナルの維持に、PDGFR α 系が必須であることを示唆する。しかしながら、これらのリガンドは全てPDGFR α を活性化し、それぞれ異なる細胞応答を引き起こすことができるため、血管新生において必須のリガンドを決定できなかった。本発明において、PDGFR α リガンド中でも、特にPDGF-Aが腫瘍血管系の形成に重要な役割を果たしていることが示された。PDGF-Aの発現の亢進は、腫瘍の悪性度と密接に関連しており、腫瘍細胞におけるPDGF-Aの発現を阻害することによって、腫瘍の増殖は劇的に抑制された (実施例5)。このように、PDGF-Aの発現を抑制、あるいはPDGF-AAとPDGFR α との結合を阻害することによって、腫瘍における血管系形成を効果的に抑制し、腫瘍を休眠に導くことができることが明らかとなった。

【0009】

例えば、PDGF-Aの発現を阻害するsiRNAまたはsiRNAを発現するベクターを腫瘍に投与す

ることによって、あるいは、可溶性PDGFR α またはPDGF-A抗体、またはそれらを発現するベクターを腫瘍に投与することによって、腫瘍における宿主血管系の形成および維持を阻害し、腫瘍の増殖を抑制、さらには虚血に導き、腫瘍を縮退させることができる。このような治療は腫瘍血管系におけるPDGFR α -p70S6キナーゼシグナル伝達を特異的に阻害することができるため、優れた治療効果を示し、かつ副作用が少ない。本発明の方法は、非常に効果的に腫瘍休眠を誘導できる新たな抗腫瘍治療方法として極めて有用である。

【0010】

すなわち本発明は、腫瘍の増殖を抑制する方法に関し、より具体的には、請求項の各項に記載の発明に関する。なお同一の請求項を引用する請求項に記載の発明の1つまたは複数の組み合わせからなる発明は、それらの請求項に記載の発現に既に意図されている。すなわち本発明は、

〔1〕PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍の増殖を抑制する方法、

〔2〕該工程が、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質をコードするマイナス鎖RNAウイルスベクターを腫瘍に投与する工程である、〔1〕に記載の方法、

〔3〕該分泌性蛋白質が可溶性PDGFR α である、〔2〕に記載の方法、

〔4〕マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、〔2〕または〔3〕に記載の方法、

〔5〕該工程が、PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、あるいは該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターを腫瘍に投与する工程である、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の方法、

〔6〕腫瘍が扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、および腺癌からなる群より選択される、〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の方法、に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍の増殖を抑制する方法に関する。PDGFR α は、PDGF-A、-B、-C等のPDGFファミリーのヘテロまたはホモダイマーの受容体であり細胞内チロシンキナーゼを活性化し自身および他の下流分子のリン酸化を誘導する (Claesson-Welsh, L. (1994) *Prog. Growth Factor Res.* 5:37)。PDGFR α の活性化は、p70S6キナーゼ (p70S6K) を介して腫瘍における血管新生を誘導する。p70S6キナーゼはmRNAの翻訳にかかわるエフェクター分子であり、PI-kinase-related kinase (PIK-RK) ファミリー蛋白質の1つであるmTORによる制御を受けている。本発明において、間葉系細胞のPDGFR α シグナル伝達経路は、損傷等による虚血における血管再生のみならず、腫瘍の血管新生にも本質的な役割を果たしていることが判明した。さらに、腫瘍血管新生においてPDGFR α シグナル伝達経路は、各腫瘍型における血管新生物質の発現パターンの多様性によらず必須であることが判明した。このように、宿主由来の血管系におけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路は、腫瘍休眠を誘導するためのユビキタスな分子標的となると結論された。さらに本発明者らは、腫瘍血管形成には、特にPDGF-Aが寄与しており、PDGF-AホモダイマーによるPDGFR α 活性化を阻害することにより、効果的に腫瘍の血管形成を阻害することができることを見出した。すなわちPDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することにより、腫瘍血管系の形成および維持を阻害し、腫瘍を虚血に導き、増殖性および生存性を失わせることができる。

【0012】

ヒトPDGF-A遺伝子および蛋白質の配列は、Accession Nos. NM-002607 (protein ID NP-002598) (配列番号：1および2)、NM-033023 (protein ID NP-148983) (配列番号：3および4)、protein ID AAA60045 等に示されている (Bonthron D.T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:1492-1496 (1988); Rorsman F. et al., *Mol. Cell. Biol.* 8:571-577 (1988); Betsholtz C. et al., *Nature* 320:695-699 (1986); Hoppe J. et al., *FEBS Lett.* 223:243-246 (1987); Takimoto Y. et al., *Hiroshima J. Med. Sci.* 42:47-52 (199

3); Tong B.D. et al., Nature 328:619-621 (1987); Collins T. et al., Nature 328:621-624 (1987); Andersson M. et al., J. Biol. Chem. 267:11260-11266 (1992)). 他の生物のPDGF-Aは、例えばラット (protein ID S25096, CAA78490) (Herren, B. et al., Biochim. Biophys. Acta 1173, 294-302 (1993))、マウス (Accession number NM-008808, protein ID NP-032834, protein ID A37359; Rorsman, F. and Betsholtz, C., Growth Factors 6, 303-313 (1992); Mercola, M. et al., Dev. Biol. 138, 114-122 (1990))、ニワトリ (Accession number BAB62542, protein ID AB031023; Horiuchi, H. et al., Gene 272, 181-190 (2001))、ウサギ (protein ID P34007; Nakahara, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 184, 811-818 (1992)) など知られている。

【0013】

哺乳動物のPDGF-A遺伝子は、既に知られているPDGF-A遺伝子に関しては、上記のPDGF-A遺伝子の配列を基にBLAST検索等により探し出すことができる (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)。あるいは、既知のPDGF-A cDNAを基に設計したプライマーを用いたRT-PCR (実施例5参照) により得ることもできるし、またはPDGF-A cDNAをプローブにしてストリンジেন্টな条件におけるハイブリダイゼーションにより、ヒト、マウス、ラット、およびその他の哺乳動物および鳥類のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより得ることも容易である。ハイブリダイゼーションの条件は、PDGF-Aのコード配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジেন্টなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5×SSC (1×SSCは150 mM NaCl, 15 mM sodium citrateを含む)、7%(W/V) SDS、100 μg/ml 変性サケ精子DNA、5×デンハルト液 (1×デンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む) を含む溶液中、48℃、好ましくは50℃、より好ましくは52℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度、より好ましくは60℃、さらにこの好ましくは65℃、最も好ましくは68℃で2×SSC中、好ましくは1×SSC中、より好ましくは0.5×SSC中、より好ましくは0.1×SSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

【0014】

哺乳動物PDGF-Aの塩基配列またはアミノ酸配列は、一般に既知のPDGF-Aの配列 (例えば配列番号: 1~4) と高いホモロジーを有する配列を含んでいる。高いホモロジーとは、70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有する配列である。配列の同一性は、例えばBLASTプログラムにより決定することができる (Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)。具体的には、塩基配列の同一性を決定するにはblastnプログラム、アミノ酸配列の同一性を決定するにはblastxプログラムを用い、例えばNCBI (National Center for Biotechnology Information) のBLASTのウェブページにおいて "Low complexity" などのフィルターの設定は全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて計算を行う (Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7:649-656)。パラメータの設定は、例えばopen gapのコストはヌクレオチドは5で蛋白質は11、extend gapのコストはヌクレオチドは2で蛋白質は1、nucleotide mismatchのペナルティーは-3、nucleotide matchの報酬は1、expect valueは10、wordsizeはヌクレオチドは11で蛋白質は2、Dropoff (X) for blast extensions in bitsはblastnでは20で他のプログラムでは7、X dropoff value for gapped alignment (in bits)はblastn以外では15、final X dropoff value for gapped alignment (in bits)はblastnでは50で他のプログラムでは25にする。アミノ酸配列の比較においては、スコアのためのマトリックスとしてBLOSUM62を用いることができる。2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、

コーディング配列 (CDS) の外側のギャップは無視して、PDGF-AのCDS全体 (例えば配列番号：1または3のCDS、あるいは配列番号：2または4) に対する同一性の値を計算する。

【0015】

また、PDGF-Aには多型およびバリエーションが存在し得る。例えばヒトPDGF-Aには、エクソン6を持つバリエーション1 (NM-002607) とエクソン6を持たないバリエーション2 (NM-033023) が知られている。PDGF-Aの多型およびバリエーションは、一般に1つのPDGF-A分子種 (例えば配列番号：1または3のCDS、あるいは配列番号：2または4) の塩基配列またはアミノ酸配列において1または複数の残基が置換、欠失、および/または挿入された配列を含み得る。公知のPDGF-Aの配列との違いは、通常30残基以内、好ましくは20残基以内、好ましくは10残基以内、より好ましくは5残基以内、より好ましくは3残基以内、より好ましくは2残基以内である。アミノ酸の置換は、保存的置換であってもよい。保存的に置換した蛋白質は活性が維持されやすい。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸 (例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸 (例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性アミノ酸 (例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性アミノ酸 (例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β 分岐アミノ酸 (例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸 (例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。

【0016】

ヒトPDGFR α 遺伝子および蛋白質の配列は、Accession number NM-006206 (protein ID NP-006197) (配列番号：5および6)、protein ID P16234 等に示されている (Matsui T. et al., Science 243:800-804 (1989); Claesson-Welsh L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:4917-4921 (1989); Kawagishi J. and Ku T., Genomics 30:224-232 (1995); Strausberg R.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903 (2002); Cools J. et al., N. Engl. J. Med. 348:1201-1214 (2003); Karthikeyan S. et al., J. Biol. Chem. 277:18973-18978 (2002))。他の生物のPDGFR α 遺伝子は、例えばマウス (Accession number NM-011058, protein ID NP-035188) (Hamilton, T.G. et al., Mol. Cell Biol. 23 (11), 4013-4025 (2003); Lih, C.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (10), 4617-4622 (1996); Do, M.S. et al., Oncogene 7 (8), 1567-1575 (1992))、ラット (Accession number XM-214030, protein ID XP-214030, P20786) (Lee, K.H. et al., Mol. Cell Biol. 10 (5), 2237-2246 (1990); Herren, B. et al., Biochim. Biophys. Acta 1173 (3), 294-302 (1993))、ニワトリ (Accession number AF188842, protein ID AAF01460; Ataliotis, P., Mech. Dev. 94 (1-2), 13-24 (2000)) などで知られている。

【0017】

哺乳動物のPDGFR α 遺伝子は、既に知られているPDGFR α 遺伝子に関してはBLAST検索等により探し出すことができる。あるいはヒトPDGFR α の塩基配列またはアミノ酸配列 (配列番号：5または6) を基に設計したプライマーを用いたRT-PCRにより得ることもできるし、または既知のPDGFR α cDNAをプローブにしてストリンジेंटな条件におけるハイブリダイゼーションにより、ヒト、マウス、ラット、およびその他の哺乳動物および鳥類のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにも得ることも容易である。ハイブリダイゼーションの条件は上記の条件を用いるとよい。他生物のPDGFR α の塩基配列またはアミノ酸配列は、公知のPDGFR α の配列 (例えば配列番号：5のCDSまたは6) と高いホモロジーを有する配列を含んでいる。高いホモロジーとは、70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有する配列である。ギャップはミスマッチと同様に扱い、CDSの外側のギャップは無視して、PDGFR α のCDS全体 (例えば配列番号：5のCDSまたは配列番号：6) に対する同一性の値を計算する。

【0018】

また、PDGFR α には多型およびバリエーションが存在し得る。例えばヒトPDGFR α の多型およびバリエーションは、例えば配列番号：5のCDSまたは配列番号：6に記載の配列において1または複数の残基が置換、欠失、および/または挿入された配列を含むものである。残基の違いは、通常100残基以内であり、好ましくは50残基以内、より好ましくは30残基以内、より好ましくは10残基以内、より好ましくは5残基以内、より好ましくは3残基以内、より好ましくは2残基以内である。アミノ酸の置換は、保存的置換であってもよい。

【0019】

PDGF-Aの発現を阻害するには、PDGF-Aの転写または翻訳を阻害したり、あるいはPDGF-A mRNAまたはPDGF-A蛋白質の安定性を低下または分解を促進させることにより実施することができる。典型的な方法としては、例えば、PDGF-A遺伝子に対してRNAi (RNA interference; RNA干渉) 効果を有するRNAを用いてPDGF-Aの発現を抑制する方法が挙げられる。一般的にRNAiとは、標的遺伝子のmRNA配列の一部と相同な配列からなるセンスRNAおよびこれと相補的な配列からなるアンチセンスRNAを含むRNAにより、標的遺伝子mRNAの破壊が誘導され、標的遺伝子の発現が阻害される現象を言う (Genes Dev. 2001, 15:188-200; Elbashir, SM et al. (2001) Nature 411:494-498)。RNAi効果を持つ2本鎖RNAが細胞内に導入されると、DICERと呼ばれるRNase III核酸分解酵素ファミリーの一種が2本鎖RNAと接触し、2本鎖RNAがsmall interfering RNA (siRNA) と呼ばれる小さな断片に分解される。このsiRNAが標的mRNAを分解し発現を抑制する。またsiRNAは、このような細胞内プロセッシングにより生成したRNAでなくても、人工的に合成または発現させたRNA分子であっても機能することができる。siRNAにより、インビボにおいて標的遺伝子の発現を抑制する方法が知られている (Anton P. et al., Nature Vol. 418 38-39 2002; David L. et al., Nature genetics Vol. 32 107-108, 2002)。

【0020】

標的遺伝子に対するsiRNAは、通常、この遺伝子の転写配列 (mRNA配列) における連続する15塩基以上の配列 (より好ましくは16塩基以上、17塩基以上、18塩基以上、または19塩基以上の配列)、およびその相補配列を含み、これらの配列がハイブリダイズして2本鎖を形成するRNAである。好ましくは、連続する17~30塩基、より好ましくは18~25塩基の配列、より好ましくは19~23塩基の配列またはその相補配列を片方の鎖に含み、これとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするもう一方の鎖を含むRNAである。しかし、より長い配列を含むRNAであっても、細胞において、RNAi効果を有するsiRNAへ分解されることが期待されるため、RNAの長さは特に制限されないと考えられる。また、標的遺伝子のmRNAの全長もしくはほぼ全長の領域に対応する長鎖二本鎖RNAを、予めDICERまたは他のRNaseで分解し、その分解産物を利用することも可能である。この分解産物には、RNAi効果を有するRNA分子 (siRNA) が含まれることが期待される。この方法によれば、RNAi効果を有することが期待されるmRNA上の領域を、特に選択しなくともよい。即ち、標的遺伝子のRNAi効果を有する配列は、必ずしも正確に規定される必要はないと考えられる。合成したsiRNAを使用する場合は、siRNAは適宜修飾することができる。

【0021】

通常、末端に数塩基のオーバーハングを有する2本鎖RNAは、RNAi効果が高いことが知られている。本発明において用いるsiRNAは、必須ではないが、末端 (好ましくは3'末端) に数塩基のオーバーハングを有することが望ましい。このオーバーハングを形成する塩基の長さは特に制限されないが、好ましくは2塩基のオーバーハングである。本発明においては例えば、TT (チミンが2個)、UU (ウラシルが2個)、その他の塩基のオーバーハングを有する2本鎖RNA (最も好ましくは19塩基対の2本鎖RNA部分と2塩基のオーバーハングを有する分子) を好適に用いることができる。本発明のsiRNAには、このようにオーバーハングを形成する塩基がDNAであるような分子も含まれる。

【0022】

siRNAにおいて塩基対を形成する2つの鎖は、スパーサーを介して連結されていてもよい。すなわち、このスパーサーがループを形成して、その前後のRNA配列同士がアニールして2本鎖を形成するRNAも好適に用いることができる。スパーサーの長さに制限はないが、

例えば3～23塩基としてよい。

【0023】

また、上記のsiRNAを発現し得るベクターもまた、本発明において使用することができる。即ち本発明は、RNAi効果を持つRNAを発現し得るベクターの使用に関する。上記RNAを発現し得るベクターは、例えば2本鎖からなるsiRNAの一方の鎖と他方の鎖が別々に発現するように、それぞれ別々のプロモーターと連結した核酸であってよい。あるいは選択的スプライシング等により1つのプロモーターから2種のRNAが転写されるようにしてもよい。あるいは、センス鎖とアンチセンス鎖がスパーサー（ループを形成する）を介して連結された一本鎖RNAを発現するベクターであってもよい。このベクターから発現したRNAは、RNAi効果を持つRNAステムを形成して標的遺伝子の発現を抑制する。ステムの長さは上記のsiRNAと同様であるが、例えば19～29塩基としてよい。スパーサーの長さに制限はないが、例えば3～23塩基としてよい。5'および/または3'に数塩基のオーバーハングを有していても、いなくてもよい。これらのベクターは、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、容易に作製することができる（Brummelkamp TR et al. (2002) Science 296: 550-553; Lee NS et al. (2001) Nature Biotechnology 19: 500-505; Miyagishi M & Taira K (2002) Nature Biotechnology 19: 497-500; Paddison PJ et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 1443-1448; Paul CP et al. (2002) Nature Biotechnology 19: 505-508; Sui G et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99(8): 5515-5520; Proc Natl Acad Sci USA 99: 14943-14945, 2002; Paddison, PJ et al. (2002) Genes Dev. 16: 948-958)。より具体的には、目的のRNA配列をコードするDNAを公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入することによって構築することが可能である。プロモーターとしては、RNAポリメラーゼIIIプロモーターなどを好適に用いることができる。具体的には、例えばU6 Pol IIIプロモーター、およびH1 RNAプロモーター（H1 RNAはRNasePを構成する一成分である）などが利用できる。

【0024】

以下に、好ましいsiRNAの一例を例示するが、本発明において用いられるsiRNAはこれらに限定されない。まず、標的遺伝子の開始コドンから、50塩基以上、好ましくは60塩基以上、より好ましくは70塩基以上下流の転写配列領域を選択する。該領域からAA配列を見つけ、該AAに続く17～20ヌクレオチド（例えばAAに続く19ヌクレオチド）を選択する。AAの次の塩基は特に制限はないが、GまたはCである配列が好適には選択される。ここで、選択する配列のGC含量は、20～80%であることが好ましく、より好ましくは30～70%、より好ましくは35～65%である。また、選択した配列は、siRNAを投与する組織で発現する遺伝子の中で、標的遺伝子に特異的な配列であることが好ましい。例えば、公共の遺伝子配列データベースで選択配列をqueryにして検索し、投与個体の遺伝子の中で標的遺伝子以外に同一の配列を転写配列に持つ遺伝子が存在しないことを確認することが好ましい。また配列は、標的遺伝子の蛋白質コード配列（CDS）内から選択することが好ましい。このようにして選択された配列の初めのAAを除く配列を含む配列（好ましくは、3'にUUまたはTTが付加されている）、およびその相補配列（好ましくは3'にUUまたはTTを有する）は、好適なsiRNAとなる。必ずしもAAに続く配列を探す必要はなく、例えばCAに続く配列を上記と同様に探してもよい。あるいは他の任意の配列であってもよい。複数種作製されたsiRNAから、最適なRNAi効果を有するRNAを適宜選択することも可能である。

【0025】

siRNAの作用には非対称性があることが知られている（Schwarz, DS. Et al., 2003, Cell 115:199-208; Khvorova A et al., Cell, 2003, 115(2):209-16）。すなわち、siRNAのセンス鎖（標的mRNA側）の3'側の2本鎖形成が、5'側のそれよりも不安定になるように配列を選択することで、標的mRNAに対するRNAi効果をより高めることができる。このために、センス鎖3'側に1から数個のミスマッチを導入してもよい。

【0026】

また、PDGF-Aの発現を阻害するには、siRNAを用いる以外にも、例えばPDGF-A遺伝子の転写産物またはその一部に対するアンチセンス核酸を用いたり、あるいはPDGF-A遺伝子の

転写産物を特異的に開裂するリボザイムを用いることができる。標的遺伝子の発現を阻害する方法として、アンチセンス技術を利用する方法が当業者によく知られている。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を阻害する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写阻害、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング阻害、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング阻害、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行阻害、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング阻害、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始阻害、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳阻害、mRNAの翻訳領域やリボソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻害、および核酸と蛋白質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現阻害などである。このようにアンチセンス核酸は、転写、スプライシングまたは翻訳など様々な過程を阻害することで、標的遺伝子の発現を阻害する（平島および井上著、新化学実験講座2 核酸IV遺伝子の複製と発現、日本生化学会編、東京化学同人、1993年、p.319-347）。

【0027】

本発明で用いられるアンチセンス核酸は、上記のいずれの作用によりPDGF-A遺伝子の発現を阻害してもよい。アンチセンス核酸としては、PDGF-A遺伝子の転写される配列の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上に対するアンチセンス配列を含む核酸であってよい。例えば、初期転写配列中のエクソン-イントロン境界、イントロン-エクソン境界、翻訳開始コドンを含む領域、5'端近傍の非翻訳領域、または成熟mRNA中の蛋白質コード配列（CDS）の連続した13ヌクレオチド以上、好ましくは14ヌクレオチド以上、さらに好ましくは15ヌクレオチド以上に対するアンチセンス配列を含む核酸などが好ましい。また臨床応用を考慮する場合、使用されるアンチセンス核酸は、通常、合成オリゴマーである。アンチセンス核酸はDNAであってよく、さらに修飾されていてもよい。例えば、ヌクレアーゼ分解に対する感受性を減らし、且つアンチセンス核酸としての活性を維持するために、5'オリゴ（ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド）を用いてもよい。アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に抑制するには、アンチセンス核酸の長さは、好ましくは17塩基以上であり、より好ましくは20塩基以上、より好ましくは25塩基以上、より好ましくは30塩基以上、より好ましくは40塩基以上、より好ましくは50塩基以上であり、さらに好ましくは100塩基以上である。アンチセンスRNAは細胞内で発現させることもできる。標的細胞で活性を持つプロモーターの下流に目的のRNAをコードする核酸を連結したベクターを作製し、これを細胞に導入すればよい。

【0028】

ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、マイナス鎖RNAウイルスベクターなどのウイルスベクターやプラスミドなどの非ウイルスベクターなどが利用できる。これらのベクター系または遺伝子導入用の担体（リボソーム、カチオン脂質など）を利用して、腫瘍に投与を行う遺伝子治療が可能となる。

【0029】

また、PDGF-A遺伝子の発現の阻害は、リボザイム、またはリボザイムをコードするベクターを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子を指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在し、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計も可能である。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型(Rossi et al. (1991) Pharmac. Ther. 50: 245-254)やヘアピン型(Hampel et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 299-304, and U.S. Pat. No. 5,254,678)と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素、1990年

、35、2191)。

【0030】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15またはU15でも切断され得ることが示されている (Koizumi, M.ら著、FEBS Lett、1988年、228、228.)。基質結合部位が標的部位近傍のRNA配列と相補的なリボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムが作出できる (Koizumi, M.ら著、FEBS Lett、1988年、239、285.、小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素、1990年、35、2191.、Koizumi, M.ら著、Nucl Acids Res、1989年、17、7059.)。

【0031】

また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される (Buzayan, JM., Nature, 1986年、323、349.)。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切断リボザイムを作出できることが示されている (Kikuchi, Y. & Sasaki, N., Nucl Acids Res, 1991, 19, 6751.、菊池洋、化学と生物、1992、30、112.)。このように、リボザイムを用いて標的遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

【0032】

リボザイムをベクターから発現させる場合は、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、マイナス鎖RNAウイルスベクターなどのウイルスベクター、あるいはプラスミドなどの非ウイルスベクターなどがベクターとして利用できる。

【0033】

また、PDGF-AAとPDGFR α との結合の阻害は、例えばPDGF-AAまたはPDGFR α に結合し、PDGF-AAとPDGFR α との結合を阻害する化合物を用いて実施することができる。このような化合物としては、PDGFR α またはそのリガンドに結合し、両者の結合を阻害する蛋白質を例示することができる。より具体的には、PDGFR α の細胞外ドメインに結合する抗体またはその断片 (抗体可変領域、CDRs (相補性決定領域) 等) を含むポリペプチド、PDGF-AAに結合する抗体またはその断片を含むポリペプチド、およびPDGFR α のリガンド結合部位を含む分泌性ポリペプチド等を好適に用いることができる。PDGFR α の細胞外ドメインに結合する抗体は、例えば、PDGFR α の細胞外ドメインまたはその一部からなるポリペプチドを抗原として、哺乳動物に免疫することにより作製することができる。あるいは、PDGFR α を発現する細胞またはその膜画分等を抗原として用いてもよい。抗原として用いられるPDGFR α の細胞外ドメインとしては、天然に見られる可溶型PDGFR α (Tiesman J, Hart CE., J Biol Chem., 1993, 268(13):9621-8)、およびPDGFR α の細胞外ドメインを含む人工的に作製した断片を用いることができる。例えば、ヒトPDGFR α (配列番号: 6) の24番目から524番目までのアミノ酸配列またはその部分を抗原として用いることが好ましい。他の哺乳動物PDGFR α の細胞外ドメインは、ヒトPDGFR α のアミノ酸配列とのアライメントにより同定することができる。脾臓細胞からハイブリドーマを作製し、PDGFR α の細胞外ドメインに高い親和性で結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択すれば、目的の抗体を産生する細胞クローンを得ることができる (V.T. Oi and L.A. Herzenberg (1980) Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. in (B.B. Misbell and S.M. Shiigi eds) Selected method in cellular immunology. pp351-372; 岩崎辰夫ら (1983) 単クローン抗体、ハイブリドーマとELISA, 講談社, 東京; 富山朔二・安東民衛 編 (1987) 単クローン抗体実験マニュアル, 講談社, 東京)。この細胞から抗体遺伝子を単離することにより、目的の抗体の遺伝子を得ることができる。これをベクターに搭載することによって、PDGFR α の細胞外ドメインに結合する抗体を発現するベクターが得られる。

【0034】

PDGFR α リガンドに結合する抗体を得るには、PDGFR α リガンドまたはその一部を抗原と

して上記と同様に免疫して抗体またはその遺伝子を得ることができる。抗体は、PDGFR α リガンドのダイマーに対する抗体であってもよい。PDGFR α リガンドとしては、PDGF-A、-B、および -Cが挙げられるが、特にPDGF-Aに対する抗体が好ましい。例えば、PDGF-Aホモダイマーに対する抗体を好適に用いることができる。

【0035】

抗体は、例えば硫酸沈殿、プロテインAカラム、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、抗原をカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することができる。抗体は、PDGF-AまたはPDGFR α に結合し、PDGF-AとPDGFR α との結合を阻害する限り、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、ヒト抗体、遺伝子組み換えによるヒト型化抗体、さらに抗体可変領域を含む断片 (Fab, Fc, F(ab')₂, scFv等を含む)、および抗体修飾物等であってもよい。抗体または抗体発現ベクターをヒトに投与する目的 (抗体治療) で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

【0036】

PDGF-AまたはPDGFR α に結合する抗体は、商業的に入手することも可能である (例えば Rabbit anti-human PDGF-AA, Cat.No. 1M-R136, DIACLONE; Anti-Human Platelet Derived Growth Factor-AA (PDGF-AA) Antibody, Leinco Technologies Inc.; Anti-PDGF-AA neutralizing goat antibody, R&D systems; Anti-PDGFR α neutralizing goat antibody, R&D systems)。

【0037】

PDGFR α のリガンド結合部位を含む分泌性ポリペプチドとしては、PDGFR α の細胞外ドメインを含む分泌蛋白質を好適に用いることができる。このような蛋白質は天然にも知られている (Tiesman J, Hart CE., J Biol Chem., 1993, 268(13):9621-8)。あるいは、PDGFR α の細胞外ドメインを含む人工的に作製した分泌蛋白質を用いることができる (実施例参照)。PDGFR α の細胞外ドメインは5つのimmunoglobulin (Ig)-like ドメインを持ち、そのうち最初の3つのドメイン (domain 1-3) (ヒトPDGFR α (配列番号:6) の24番目から341番目のアミノ酸) がリガンド結合活性を示すことが知られている (D. Mahadevan et al., J. Biol. Chem., 270, 1995, 27595-27600; B Herren et al., J. Biol. Chem., 268, 15088-15095, 1993)。従って、この3つのIg-like領域、好ましくは5つのIg-like領域 (ヒトPDGFR α (配列番号:6) の24番目から524番目のアミノ酸) を含む分泌蛋白質を用いることによって、PDGF-AAを吸収させ内在性受容体への結合を阻害することができる。蛋白質を分泌させるために、N末端には適宜分泌シグナル配列を付加することができる。分泌シグナル配列としては、例えばヒトPDGFR α の1番目から23番目までのアミノ酸を用いればよく、ヒトPDGFR α の1番目から524番目のアミノ酸を含む可溶性蛋白質を好適に用いることができる。他の哺乳動物PDGFR α の細胞外ドメインは、ヒトPDGFR α のアミノ酸配列とのアライメントにより同定すればよい。

【0038】

ベクターを介した遺伝子治療により上記の蛋白質を発現させるには、遺伝子組み換え技術により上記の蛋白質をコードする核酸を搭載するベクターを構築することができる。ここで蛋白質をコードするとは、核酸が該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンス (ある種のウイルスベクター等においては) に含むことを言う。核酸はベクターの種類にあわせて一本鎖または二本鎖であってもよい。また核酸はDNAであってもRNAであってもよい。ベクターとしては、例えばプラスミドベクター、その他のnaked DNA、ウイルスベクター等が挙げられる。

【0039】

Naked DNAとは、DNAが、ウイルスエンベロープ、リボソーム、またはカチオニック脂質などの核酸を細胞に導入する試薬と結合していないDNAを言う (Wolff et al., 1990, Science 247, 1465-1468)。この場合、DNAは生理的に許容可能な溶液、例えば滅菌水、生理食塩水、または緩衝液中に溶解して使用することができる。プラスミドなどのnaked DNAの注入は最も安全で簡便な遺伝子送達法であり、これまでに承認されている臨床プロトコ

ルの多くを占める (Lee, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 272: 230-235)。例えば、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターは入手可能な最も強力な転写制御配列の1つであり、CMVプロモーターを含むベクターは臨床の遺伝子治療にも広く用いられている (Foecking, M.K. and Hofstetter H. Gene 1986; 45: 101-105)。また、CMV immediately early エンハンサーおよびニフトリβアクチンプロモーターを含むキメラプロモーターであるCAGプロモーター (Niwa, H. et al. (1991) Gene. 108: 193-199) は、CMVプロモーター以上に強い発現が可能であり好適に用いられる。

【0040】

ベクターに目的遺伝子を組み込む場合は、目的遺伝子の発現効率を高めるため、開始コドン周辺の配列はKozakのコンセンサス配列 [例えばCC(G/A)CCATG] とすることが好ましい (Kozak, M., Nucleic Acids Res. 9(20), 5233 (1981); Kozak, M., Cell 44, 283 (1986); Kozak, M. Nucleic Acids Res. 15:8125 (1987); Kozak, M., J. Mol. Biol. 196, 947 (1987); Kozak, M., J. Cell Biol. 108, 229 (1989); Kozak, M., Nucl. Acids Res. 18, 2828 (1990))。

【0041】

DNAは適宜トランスフェクション試薬と組み合わせて投与することができる。例えば、リボソームまたは所望のカチオン性脂質と結合させてトランスフェクション効率を上昇させることができる。

【0042】

本発明に用いられるより好ましいベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターを用いることによって、幅広い組織において十分な量のポリペプチドを発現させることができる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、マイナス鎖RNAウイルスベクターなどが挙げられるがこれらに制限されない。好ましいウイルスベクターの1つはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスベクターは、広範囲の組織に高い効率で遺伝子を導入し、導入遺伝子を高発現させることができる。本発明においてはアデノウイルスベクターを好適に用いることができる。本発明において、アデノウイルスベクターは適宜公知のベクターを用いることができ、それらは例えば外来遺伝子発現の向上のため、または抗原性の減弱などのために野生型ウイルスの遺伝子が改変されていてよい。アデノウイルスベクターの作製は、例えば斎藤らにより開発されたCOS-TPC法 (Miyake, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320-1324 (1996)) を用いることができる。

【0043】

本発明において好適に用いることができるウイルスベクターの他の1つは、マイナス鎖RNAウイルスベクターである。実施例に示すように、マイナス鎖RNAウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、インビボにおいて腫瘍増殖を有意に抑制することが示された。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、本発明において最も好適に用いられるベクターの1つである。マイナス鎖RNAウイルスとは、マイナス鎖(ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖に対するアンチセンス鎖)のRNAをゲノムとして含むウイルスである。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖RNAとも呼ばれる。本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスとしては、特に一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(非分節型(non-segmented)マイナス鎖RNAウイルスとも言う)が挙げられる。「一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルス」とは、一本鎖ネガティブ鎖[すなわちマイナス鎖]RNAをゲノムに有するウイルスを言う。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubellavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス(Filoviridae)、オルトミクソウイルス(Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses 等を含む)、ブニヤウイルス(Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス(Arenaviridae)などの科に属するウイルスが含まれる。本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルス

ベクターは、伝播能を有していてもよく、伝播能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「伝播能を有する」とは、ウィルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウィルスが複製され、感染性ウィルス粒子が産生されることを指す。

【0044】

本発明において特に好適に用いられるマイナス鎖RNAウィルスを具体的に挙げれば、例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) ウィルスのセンダイウィルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウィルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウィルス (Mumps virus)、麻疹ウィルス (Measles virus)、RSウィルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウィルス (rinderpest virus)、ジステンパーウィルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウィルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウィルス1,2,3型、オルトミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae) のインフルエンザウィルス (Influenza virus)、ラブドウィルス科 (Rhabdoviridae) の水疱性口内炎ウィルス (Vesicular stomatitis virus)、狂犬病ウィルス (Rabies virus) 等が例示できる。

【0045】

本発明において用いることができるウィルスをさらに例示すれば、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、および Newcastle disease virus (NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin morbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、および Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウィルスが挙げられる。

【0046】

より好ましくは、パラミクソウイルス亜科 (レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモルビリウイルス属を含む) に属するウィルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属 (genus Respirivirus) (パラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) とも言う) に属するウィルスまたはその誘導体である。誘導体には、ウィルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウィルス遺伝子が改変されたウィルス、および化学修飾されたウィルス等が含まれる。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウィルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウィルス1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウィルス3型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウィルス3型 (BPIV-3)、センダイウィルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウィルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウィルス10型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウィルスである。これらのウィルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。

【0047】

組み換えマイナス鎖RNAウィルスベクターの再構成は公知の方法を利用して行うことができる (W097/16539; W097/16538; W000/70055; W000/70070; W003/025570; PCT/JPO3/07005; PCT/JPO2004/000944; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404; Hasan, M. K.

et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから再構成させることができる。これらの方法に準じて、本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスを再構成させることができる。ウイルスゲノムをコードするDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子等のエンベロープを構成する蛋白質をコードする遺伝子をウイルスゲノムから欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質（例えば水疱性口内炎ウイルス（Vesicular stomatitis virus; VSV）のG蛋白質（VSV-G）（J. Virology 39: 519-528（1981）））をコードする遺伝子などを別途、細胞に導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である（Hirata, T. et al., 2002, J. Virol. Methods, 104:125-133; Inoue, M. et al., 2003, J. Virol. 77:6419-6429）。

【0048】

マイナス鎖RNAウイルスは宿主細胞の細胞質でのみ転写・複製を行い、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み（integration）は起こらない（Lamb, R.A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields Virology, 3rd Edition, Vol. 2. Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204)。このため染色体異常による癌化および不死化などの安全面における問題が生じない。マイナス鎖RNAウイルスのこの特徴は、ベクター化した時の安全性に大きく寄与している。異種遺伝子発現の結果では、例えばセンダイウイルス（SeV）を連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、ゲノムの安定性が高く、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている（Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466（1997））。また、カプシド構造蛋白質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性（flexibility）など性質上のメリットがある。またセンダイウイルスは、齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性が認められない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている（Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997; Bitzer, M. et al., J. Gene Med., 5: 543-553, 2003）。このように、マイナス鎖RNAウイルスベクターは、本発明において用いられるベクターとして極めて有用である。

【0049】

回収したウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション（濾過）、遠心分離、吸着、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその任意の組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターを含む溶液中で該ウイルスの成分が主要な割合を占めることを言う。例えば実質的に純粋なウイルスベクター組成物は、溶液に含まれる全蛋白質（但しキャリアや安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクターの成分として含まれる蛋白質の割合が10%（重量/重量）以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。例えばパラミクソウイルスベクターであれば、具体的な精製方法としては、セルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができるが、これらに制限されない。

【0050】

腫瘍増殖の抑制は、上記に記載したPDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物、核酸、蛋白質、あるいはそれらを発現するベクターを、腫瘍

に投与することにより行われる。ここで「腫瘍に投与する」とは、腫瘍の血管系の形成および/または維持を阻害するように、腫瘍内または腫瘍の近傍に投与することを言う。近傍とは、腫瘍に十分近い領域であって、投与領域の血管系の破壊により腫瘍への血液供給を有意に低下させ得る領域である。通常は、腫瘍から9 mm以内、好ましくは8 mm以内、より好ましくは7 mm以内、より好ましくは6 mm以内、より好ましくは5 mm以内、より好ましくは3 mm以内の領域である。投与物または投与したベクターからの発現産物により、PDGFR α -p70S6キナーゼシグナル伝達が阻害され、腫瘍近傍の血管系の形成および維持が阻害される。これにより、腫瘍への血液供給が遮断され、腫瘍増殖が抑制される。投与化合物またはベクターは、担体と組み合わせた組成物として投与することができる。用いられる担体としては、生理的に許容できるものであれば制限はなく、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などがあげられる。更に担体はこれらの生理的に許容される材料の混合組成物でも良い。ベクターを投与する場合は、ウイルスベクター、あるいは非ウイルスベクターも含めて、所望のベクターが利用できる。ベクターから分泌性蛋白質を発現させる場合は、ベクターを投与した細胞の形態で投与してもよい (ex vivo投与)。例えばベクターまたはベクターを導入した細胞の腫瘍内注入が考えられる。注入手段は通常の医療用注射器または、体外および体内に留置される持続注入器などの工業製品があげられる。

【0051】

投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状、投与組成物の形態、投与方法等により異なっており、当業者であれば適宜調整することが可能である。投与回数は、1回または臨床で容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、投与部位についても1箇所または複数箇所投与してよい。例えばウイルスベクターであれば、腫瘍内またはその近傍に1箇所または複数箇所（例えば2から10箇所）に投与してよい。投与量は、アデノウイルスであれば、例えば $10^{10} \sim 10^{13}$ pfu、より好ましくは $10^{11} \sim 10^{13}$ pfuが望ましい。マイナス鎖RNAウイルスであれば、例えば 2×10^5 CIU $\sim 5 \times 10^{11}$ CIU が望ましい。Naked DNA、アンチセンス核酸、siRNA等であれば、腫瘍内またはその近傍に1箇所または複数箇所（例えば2から10箇所）に投与してよい。投与部位1箇所あたりの投与量は、例えば $10 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg}$ 、より好ましくは $100 \mu\text{g} \sim 1 \text{ mg}$ が望ましい。Ex vivo投与において、ベクターを導入した細胞を投与する場合は、例えば MOI 1 ~ 500 の間で体外（例えば試験管またはシャーレ内）で標的細胞にウイルスベクターを導入する。遺伝子導入細胞は、例えば $10^5 \sim 10^9$ 細胞、好ましくは $10^6 \sim 10^8$ 細胞を腫瘍に移植することができる。投与量については、文献 Freedman SB et al Ann Intern Med 136:54-71 (2002) を参照することができる。治療の対象動物としては、ヒトおよびその他の所望の非ヒト哺乳動物が挙げられ、具体的にはヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなどが含まれる。

【0052】

また本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物を有効成分として含む抗腫瘍剤にも関する。また本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する化合物の、抗腫瘍治療薬製造における使用にも関する。ここで、上記化合物としては、PDGF-A遺伝子のアンチセンスRNA、siRNA、および該アンチセンスRNAまたはsiRNAをコードするベクターが例示できる。さらに、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する分泌性蛋白質、または該分泌性蛋白質をコードするベクターが挙げられる。このような分泌蛋白質としては、PDGF-AホモダイマーまたはPDGFR α に結合する抗体、抗体断片、および可溶性PDGFR α 等が挙げられる。ベクターとしては、例えばマイナス鎖RNAウイルスベクターを好適に用いることができる。ベクターは、腫瘍へ局所的に投与のために注射剤等の形態に製剤化されることが好ましい。

【0053】

上記の抗腫瘍剤は、有効成分以外に、薬学的に許容できる所望の担体および/または添加物等を含む組成物であってよい。例えば、滅菌水、生理食塩水、慣用の緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、安定剤、塩、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、界面活性

剤、懸濁剤、等張化剤、または保存剤などを含んでよい。局所投与のために、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などと組み合わせることも好ましい。注射に適切な剤型に調製するには、有効成分を薬学的に許容される水溶液中に溶解するか、または溶解できるように例えば凍結乾燥製剤として調製する。また、有効成分を溶解または希釈するための担体と組み合わせキットとしてもよい。このような担体としては、薬学的に許容できる所望の担体が挙げられ、例えば蒸留水、生理食塩水などが挙げられる。

【実施例】

【0054】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

【0055】

細胞および試薬

HSMC、MRC-5、SAS、MH134、QG56、TF、KN、EBC-1、PC9、および COS7細胞はAmerican Type Culture Collectionより購入した。以前の記載のように、以下の細胞内シグナル阻害剤を、それぞれ以下の濃度でHSMCおよびMRC5細胞に用いた (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。Ras, Ras-inhibitory peptide (50 μ mol/L, Alexis Japan, Tokyo, Japan); p70S6K, p70S6K inhibitor rapamycin (100 ng/ml, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan); PKC, PKC inhibitor bisindolylmaleimide (100 nmol/L, Sigma); PI3K, PI3K-inhibitor wortmannin (120 nmol/L, Sigma); MEK inhibitor U0126 (10 μ mol/L, Promega K.K., Tokyo, Japan); PKA, PKA-inhibitory peptide (1 μ mol/L, Calbiochem, San Diego, CA); およびNF- κ B, NF- κ B inhibitor ALLN (5 μ mol/L, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)。抗PDGF-AA-中和ヤギ抗体、抗PDGFR α 中和ヤギ抗体、およびコントロールのヤギIgGはR&D systems (Minneapolis, MN) より入手した。マウスFGF-2をコードするSeV (SeV-FGF2) およびホタルルシフェラーゼをコードするSeV (SeV-luciferase) を含む、使用した組み換えSeVのストックは、以前の記載の通りに調製した (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。ヒトPDGFR α の細胞外ドメインを発現する組み換えSeVは以下のように構築した。制限酵素タグ付きの合成プライマー (forward-BglII: 5'-aaAGATCTatgggggaacttcccatccggc-3' (配列番号: 9), reverse-NheI: 5'-ttGCTAGCtcacttgatcatcgctcgctccttgtagtcttcagaacgcagggt-3' (配列番号: 10)) を用いて、MRC-5細胞より抽出したtotal RNAより逆転写により合成したcDNAを鋳型にしてcDNA断片 (増幅領域: CDSの1-1575塩基) を増幅し、pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローニングした (配列番号: 7および8)。capillary sequencer (model CEQ2000L, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA) を用いて、全配列が報告されているもの (GenBank No. NM-006206) と完全に一致することを確認し、SeV18+をコードする鋳型プラスミドにサブクローニングした (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。以前の記載のように、可溶性ヒトPDGFR α を発現する組み換えSeV (SeV-hsPDGF α) を回収した (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730; Yonemitsu Y et al., Nat Biotechnol. 2000;18:970-973)。ウェスタンブロッティングにより、SeV-hsPDGF α を導入したCOS7細胞の培養上清中に、可溶性ヒトPDGFR α が分泌されていることが確認された (データ非提示)。

【0056】

動物

雄C57BL/6 (6週齢) およびbalb/c nu/nu マウス (5週齢) はKBT Oriental Co., Ltd. (Charles River Grade, Tosu, Saga, Japan) より入手した。全ての動物実験は、認可された手順に従って実施し、九州大学における動物、組み換えDNA、および感染性病原体実験委員会による研究動物の飼育および使用の推奨手順および日本国政府の法律(No. 105)および告知(No. 6)に従った。

【0057】

肢虚血モデル

外科的処置および肢の予後評価の詳細は以前に記載されている (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。遺伝子導入では、手術完了の直後に25 μ lのベクター溶液を大腿筋2箇所に入射した。内在性PDGF-AA活性のインビボ抑制は、PDGF-AA特異的中和ヤギポリクローナルIgG (ヒトおよびマウス蛋白質に交差反応する) (R&D) を用い、ディスポーザブルのマイクロ浸透圧ポンプ (Model 1007D, ALZA Co., Mountain View, CA) を介して以前の記載の通りに行った (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。

【0058】

腫瘍移植

10⁶ のSASまたはMH134細胞を腹壁の皮内に移植し、腫瘍容積を1日おきに評価した。移植から7日後、RAPA (1.5 mg/kg/day) を毎日腹腔内投与した。Day 7または28に、マウスを犠牲死させ腫瘍をELISAに供した。

【0059】

酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA)

以前の記載 (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730) の通り、マウス肢筋、腫瘍、および培養液中の蛋白質含量を、Quantikine Immunoassay systemsを用い、製造元の説明に従ってマウス (164および220アミノ酸残基型の両方を認識) およびヒトVEGF-A、ヒトFGF-2 (ヒトおよびマウスの両方を認識)、ヒトHGF (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)、およびラットHGF (マウスHGFも認識, Institute of Immunology Inc. Tokyo, Japan) について決定した。

【0060】

ノーザンブロット解析

全細胞RNAをISOGEN system (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) で単離し、電気泳動しナイロンメンブレンに転写した。メンブレンは、ランダム[α -³²P]dCTPラベルしたプローブと60℃で一晩ハイブリダイズさせた。バンドを可視化しphotoimagerでデンストメトリーに供した。

【0061】

リアルタイムPCR

ISOGEN system を用いて虚血肢筋から全RNAを抽出し、RNaseフリーDNase (Boehringer) で処理した。分注 (25 ng) した全RNAを逆転写し、TaqMan EZ RT-PCR kitおよびSequence Detection System, model 7000 (PE Biosystems) を用いて製造元の説明に従いトリプlicateで増幅した。PCTプライマーおよびTaqManプローブの塩基配列を表に示した。マウスGAPDHコントロール試薬を内部標準として用いた。コントロールの全RNA (PE Biosystems) の連続希釈を用いて構築した相対標準曲線から製造元の説明に従い標的量を決定した。各試料において標的遺伝子の発現レベルをGAPDHレベルにより標準化した。

表 1

リアルタイムPCRに用いたプライマーおよびプローブの配列

VEGF (アンプリコンサイズ: 137 bp)

VEGF-forward 5'-GCAGGCTGCTGTAACGATGAA-3' (配列番号: 11)

VEGF-reverse 5'-TCACATCTGCTGTGCTGTAGGA-3' (配列番号: 12)

VEGF-hybridization probe 5'-FAM-CATGCAGATCATGCGGATCAAACCTC-TAMRA-3' (配列番号: 13)

HGF (アンプリコンサイズ: 87 bp)

HGF-forward 5'-CAGCAATACCATTTGGAATGGAAT-3' (配列番号: 14)

HGF-reverse 5'-TTGAAGTTCTCGGGAGTGATATCA-3' (配列番号: 15)

HGF-hybridization probe 5'-FAM-CGTTGGGATTGCGAGTACCCTCACA-TAMRA-3' (配列番号: 16)

PDGF-A (アンプリコンサイズ: 125 bp)

PDGF-A-forward 5'-CGTCAAGTGCCAGCCTTCA-3' (配列番号: 17)

PDGF-A-reverse 5'-ATGCACACTCCAGGTGTTCT-3' (配列番号: 18)

PDGF-A-hybridization probe 5'-FAM-CACTTTGGCCACCTTGACACTGCG-TAMRA-3' (配列番号: 19)

PDGFR α (アンプリコンサイズ: 148 bp)

PDGFR α -forward 5'-GAGCATCTTCGACAACCTCTACAC-3' (配列番号: 20)

PDGFR α -reverse 5'-CCGGTATCCACTCTTGATCTTATTG-3' (配列番号: 21)

PDGFR α -hybridization probe 5'-FAM-CCCTATCCTGGCATGATGGTTCGATTCT-TAMRA-3' (配列番号: 22)

GAPDH (アンプリコンサイズ: 117 bp)

GAPDH-forward 5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTAT-3' (配列番号: 23)

GAPDH-reverse 5'-TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT-3' (配列番号: 24)

GAPDH-hybridization probe 5'-FAM-TGCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGT-TAMRA-3' (配列番号: 25)

【0062】

レーザードップラー環流像

腫瘍内血流をレーザードップラー環流像 (Laser Doppler perfusion image; LDPI) 解析機 (Moor Instruments, Devon, UK) を用いて以前の記載の通りに評価した (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。小腸の血流によるバックグランドノイズを除去するため、測定の前直前にブルーシートを腹腔に挿入した。周囲の明るさおよび温度によるデータのばらつきを最小化するため、LDPIインデックスは陰嚢内のpixelに対する腫瘍内のpixelの比として表した。

【0063】

統計解析

全てのデータは平均±SEMとして表し、Fisherの補正によるone-way ANOVAで解析した。生存解析では、救肢スコア (limb salvage score) で表した生存率 (Masaki I et al., FASEB J. 2001;15:1294-1296) をKaplan-Meyer法で解析した。生存実験の統計的有意性はlog rank testで決定し、P<0.05を統計的有意とした。

【0064】

【実施例1】

本実施例では、FGF-2およびPDGF-AAは、FGF-2が媒介するPDGFR α のアップレギュレーションを介して協同的にVEGFおよびHGF/SF発現を亢進することを示す。

宿主血管系の血管新生応答におけるPDGF-AAシグナルの役割を評価するため、血清フリーの条件で培養したヒトMC (MRC5およびHSMC) におけるFGF-2を介したVEGFおよびHGFの誘導を調べた。図1Aに示すように、MRC5細胞の培養液中へのVEGF放出は、FGF-2により刺激されたが、PDGF-AAによっては刺激されなかった (図1A左)。逆に、PDGF-AAはHSMC培養液中のVEGF量をアップレギュレートしたが、FGF-2はVEGFをアップレギュレートしないことが判明した (図1A右)。一方、FGF-2およびPDGF-AAを用いた共刺激は、MRC5およびHSMCの両方の細胞型において、VEGF発現 (図1A) およびHGF/SF発現 (データ非提示) に関して協同的な増強効果を示すことが判明した。MRC5細胞と同様に、マウス線維芽細胞株NIH3T3でも、VEGFおよびHGF発現に対するFGF-2とPDGF-AAの協同効果が観察された (データ非提示) ことから、このような効果は動物種によらず間葉系細胞に共通していることが示された。虚血治療等の臨床場面においても、FGF2およびPDGF-AAを投与することにより、それぞれを単独で投与するよりも高い効果で血管新生を誘導することが可能と考えられる。ノーザンブロット解析により、MRC5およびHSMCの両方の細胞型においてFGF-2を介したPDGFR α 転写のアップレギュレーションが示されたが (図1B)、PDGF-AAはFGFR1の発現は変化させなかった (データ非提示)。これらの知見は、FGF-2は、間葉系細胞におけるVEGFおよびHGF/SFの発現を調節するPDGF-AAの応答を、PDGFR α の転写調節を介して調節していること

を示唆している。

【0065】

[実施例2]

本実施例では、間葉系細胞におけるFGF-2依存的VEGFおよびHGF/SF発現はPDGFR α により媒介され、PDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の阻害によりシャットダウンされることを示す。

MCにおけるVEGFおよびHGF/SF発現に及ぼすFGF-2およびPDGF-AAの協同的効果に加え、本発明者らは、以前、FGF-2は、HSMCにおけるHGF/SFの持続発現に寄与するRasおよびp70S6Kシグナル伝達を介して、PDGF-AAの内在発現を上昇させることを見出した (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)。本発明者らは、線維芽細胞 (MRC5細胞) においても、VEGFおよびHGF/SF発現において類似した系が見られると予想した。以前の研究で観察されたように、FGF-2は典型的にVEGFおよびHGF/SF蛋白質をアップレギュレートし、これらの効果はMEK阻害剤、Ras-inhibitory peptide、およびp70S6Kインヒビター (RAPA) によって失われた (図2A)。MRC5細胞におけるFGF-2を介したVEGF発現の時間経過の繰り返しノーザンブロット解析では、HSMCを用いたHGF/SF発現の場合で以前みられたのと同様に (Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730)、bi-phasic (3時間目とそれより後) なVEGFのアップレギュレーションが起こることが判明した (図2B)。初期の方のVEGF発現はRAPA処理により影響されないが、後期の持続的発現はRAPA処理により完全に消滅した (図2B)。さらに、FGF-2を介したVEGF蛋白質のアップレギュレーションは、抗PDGFR α 抗体により完全になくなり (図2C)、RAPAで観察されたのと同様であった (図2A)。HGF/SF発現についても同じ結果が得られたことから (データ非提示)、MCにおいてPDGFR α 系は、FGF-2を介したVEGFおよびHGF/SF発現の増強および持続に必須の役割を果たしていると結論された。

【0066】

[実施例3]

本実施例では、PDGFR α は、マウス重症肢虚血におけるFGF-2の治療効果に必須の役割を果たすことを示す。

インビボにおけるFGF-2-PDGFR α -VEGF/HGFの予想されるカスケード様の関連を調べるため、FGF-2を発現する組み換えセグメンタイルウイルス (SeV-FGF2) をインビボで用いて、2つの別々のマウス肢虚血モデル、すなわちC57BL/6マウスの救肢モデル (limb salvage model) および balb/c nu/nu マウスの肢脱落モデル (autoamputation model) (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973) を評価した (Masaki I et al., Circ Res. 2002;90:966-973; Onimaru M et al., Circ Res. 2002;91:723-730; Compagni A et al., Cancer Res. 2000;60:7163-7169; Yonemitsu Y et al., Nat Biotechnol. 2000;18:970-973; Masaki I et al., FASEB J. 2001;15:1294-1296; Yamashita A et al., J Immunol. 2002;168:450-457; Shoji F et al., Gene Ther. 2003;10:213-218)。救肢モデルでは、ELISAによるアッセイでFGF-2の過剰発現が確認されたが (データ非提示)、リアルタイムPCRによる定量アッセイではPDGF-AおよびPDGFR α の両mRNAのアップレギュレーションが確認された (図3AおよびB)。同じ組織サンプルにおいて、FGF-2によりVEGFおよびHGF/SF発現も同様に増強することが観察され、その効果は抗PDGF-AA中和抗体により消滅し、またRAPA処理によっても消滅した (図3CおよびD)。RAPAのこの効果は蛋白質レベルでも確認された (図3EおよびF)。また、肢脱落モデルにおけるFGF-2の治療効果は抗PDGF-AA抗体およびRAPAにより失われた (図4) ことから、PDGFR α 系はFGF-2を介した治療的な血管新生においても必須の役割を果たしていることが示された。

【0067】

[実施例4]

本実施例では、PDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の阻害は、各腫瘍型における血管新生因子群の発現の多様性とは無関係に腫瘍休眠 (tumor dormancy) を誘導することを示す。

腫瘍フリー系での結果は、MCにおけるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路は血管新生に必須であり、RAPAはFGF-2を介した血管新生における抗PDGF-AA抗体の効果を模倣することを

示唆する。しかしながら、ユビキタスな血管新生反応における、血管新生刺激とは無関係にRAPAが作用できるのかについては疑問がある。これを明らかにするため、2つの別々の腫瘍細胞株を用いて腫瘍血管新生の試験を行った。腫瘍細胞株としては、VEGF、FGF-2、およびPDGF-AAを高レベルで発現するヒト口腔扁平上皮細胞癌であるSAS、およびSASに比べVEGFおよびFGF-2の分泌がはるかに低く、PDGF-AAの発現は見られないマウス肝細胞癌であるMH134を用いた。

【0068】

図5A~Dに示すように、RAPAはSASおよびMH134両方の腫瘍型の増殖を抑制したことから、RAPAの抗腫瘍効果は各腫瘍型の血管新生増殖因子の発現パターンとは無関係であることが示唆された。PDGFR α -p70S6K経路における抗腫瘍効果が腫瘍型に依存しないことを示す証拠をさらに得るため、ヒトPDGFR α 可溶型を発現するSeV-hsPDGFR α を腫瘍内注射し、腫瘍の増殖をアッセイする実験を行った。期待したように、SeV-hsPDGFR α は両腫瘍型の増殖を有意に阻害した(図5E~F)。実験の終了時に腫瘍重量を測定したところ、ルシフェラーゼを発現するSeVベクターを投与したコントロールに比べ、SeV-hsPDGFR α を投与した腫瘍重量は両腫瘍型とも有意に減少していた(SAS-luciferase: 415.1 ± 104.9 mg vs. SAS-hsPDGFR α 54.3 ± 9.6 mg, MH134-luciferase: $3,930.4 \pm 304.4$ mg vs. MH134-hsPDGFR α $2,654.4 \pm 296.5$ mg, それぞれ $P=0.0027$ および $P=0.0106$ 、平均 \pm S.E.)。

【0069】

RAPA処理では内皮の直接的増殖阻害(Vinals F et al., J Biol Chem. 1999;274:26776-26782; Yu Y et al., J Cell Physiol. 1999;178:235-246)などの、p70S6K阻害とは別の抗腫瘍作用があることを考慮すると、SeV-hsPDGFR α によるPDGFR α -p70S6K経路の阻害作用は非常に高く、複数回投与を行えば、より効果的に腫瘍増殖を抑制することが可能と考えられる。

【0070】

PDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の阻害による抗腫瘍効果が血管新生因子の発現パターンによらないことを確かめるため、インビボおよびインビトロにおいて、RAPAの存在下および非存在下におけるVEGFの発現を調べた。培養系においては、100 ng/mlのRAPAはSASの内因的VEGF分泌量を基底状態の約30から50%に有意に減少させた。調べた他の腫瘍(口腔扁平上皮細胞癌: QG56、TF、KN、EBC-1、および腺癌: PC9)でも、normoxiaの条件で基底状態からの同様の減少が見られた。同様の知見は他のグループからも報告されている(Guba M et al., Nat Med. 2002;8:128-135)。また、各腫瘍型においてPDGF-AAおよびFGF-2発現に対するRAPAの影響は観察されなかった(データ非提示)。しかしながら、MH134腫瘍のインビボ評価においては、RAPA処理して3日または7日後の腫瘍内でのVEGF発現は、バッファーで処理したコントロールと比べ有意に上昇した(図6A)。さらに、両方の腫瘍において、RAPA注入の開始から7日後の血流が減少していることが、ドップラー環流像解析により判明した(図6B)。

【0071】

これらの結果は以下のように説明し得る。RAPA処置は低酸素症(hypoxia)を誘導し、その結果、hypoxiaに依存した機構を介してVEGFがアップレギュレートされ、RAPAを介したダウンレギュレーションを相殺された。この機構は、以下のようにして確認された。培養MH134におけるhypoxia (2.5% O₂)が誘導するVEGF発現に対して、RAPAは、有意ではあるが、最小限の効果しか示さない(図6C)。同様の結果が、調べた全ての細胞株で得られた(データ非提示)。

【0072】

そこで、SASのxenograftモデルにおいて、ヒトおよびマウス特異的ELISA系を用いてVEGFの起源を調べた。固形癌において、RAPAはマウスVEGF量には影響せず、ヒトVEGFを有意に上昇させたことから(図6D)、腫瘍細胞由来のVEGFの上昇は、各腫瘍型の血管新生因子の発現の多様性によらず、宿主血管系を標的とする血管新生によるhypoxiaに媒介されることが示された。

【0073】

【実施例 5】

本実施例では、PDGF-Aの発現の阻害による腫瘍増殖の抑制を例示する。

ヒトPDGF-A遺伝子のクローニングを以下のように行った。MRC5細胞 mRNAより逆転写 (Isogen, Oligo dT primerを使用) したcDNAを用い、フォワードプライマー AAGAATTCATGAGGACCTTGCTTGCCCTGC (配列番号: 26)、リバープライマー AAGAATTCCTTAGGTGGGTTTTAACCTTTTCTTTT (配列番号: 27) を用いてPCRを行った (下線部はEcoRI部位)。96℃5分の後、96℃30秒-60℃45秒-72℃45秒を35サイクル行い、72℃5分を行った。PCR産物 (636 bp) をTAクローニングベクター pCR II (登録商標, Invitrogen) にサブクローニングした。配列をシーケンシングにより確認後、制限酵素EcoRIにて切り出し、発現ベクター pcDNA 3.1(+) (登録商標, Invitrogen) へサブクローニングした。制限酵素SacIで切断して方向性を確認し、アンチセンス遺伝子を同定した (pcDNA3-asPDGFA)。

【0074】

外来的に導入したVEGF遺伝子の発現に対するPDGF-Aの発現の有無の影響を調べるため、NIH3T3細胞にヒトVEGF165発現プラスミドベクター (pcDNA3-hVEGF165) とアンチセンスヒトPDGF-A発現ベクター (pcDNA3-asPDGFA) を同時に遺伝子導入した。コントロールとして、空ベクター (pcDNA 3.1) またはヒトVEGF165発現プラスミドベクター (pcDNA3-hVEGF165) を単独で導入した細胞を作製しVEGFレベルを比較した。その結果、空ベクター (pcDNA 3.1) 導入細胞からのVEGF発現は検出されず、pcDNA3-hVEGF165単独を導入した細胞からのVEGFレベルは 2.42 ± 0.73 (平均 \pm S.E.)、pcDNA3-hVEGF165およびpcDNA3-asPDGFAを共導入した細胞からのVEGFレベルは 2.27 ± 0.57 であり、VEGF165レベルは、pcDNA3-asPDGFAの導入の有無により有意な影響を受けず、PDGF-Aのアンチセンスによる外来VEGF発現への干渉は見られないことが判明した (図7)。

【0075】

ヒト扁平上皮癌、腺癌に対し、アンチセンスヒトPDGF-A発現ベクター (pcDNA3-asPDGFA) を遺伝子導入し、安定形質転換細胞株の作製を行った。具体的には、腫瘍細胞株 (SAS, TF, QG56, A549) へLipofectamine (登録商標, Life Technologies) にてpcDNA3-asPDGFAをトランスフェクション後、G418 $500 \mu\text{g/ml}$ (Promega) にて培養し、形質転換細胞株を得た。これらの細胞を96 well plateにてsingle cell cultureを行い、ELISAにてPDGF-A発現抑制の強いコロニーを選択した。同過程を3回繰り返し行った。得られた腫瘍細胞 5×10^5 個を6 well plateに撒き、一晚培養し、血清不含RPMI 1640 培地にて2回washし、血清不含RPMI 1640 培地 1mlにて24時間インキュベートした。その後細胞を回収し、PDGF-AA ELISA kit (R&D) にてPDGF-AAの発現レベルを定量した。同様に、培養液中に分泌されたVEGFを、ELISAにて定量した。コントロールとして空ベクターを導入した腫瘍細胞を作製した。

【0076】

図8(A)は、各種癌細胞におけるPDGFR α の発現をRT-PCRにより測定した結果を示す。対象とした腫瘍細胞全てにPDGFR α が発現していることが判明した。これらの癌細胞にアンチセンスヒトPDGF-A発現ベクターを導入したところ、全ての腫瘍細胞において、PDGF-AAの発現レベルを有意に低下させると同時に、VEGFの発現レベルも低下させることが判明した (図8(B)~(E))。

【0077】

次に、PDGF-Aの発現を阻害した癌細胞について、腫瘍移植アッセイにより腫瘍の増殖性の変化を調べた。上記で作製した形質転換腫瘍細胞 1×10^6 個を、Balb/c nudeマウス (5週齢、雄) の側腹部へ皮下注射した。以降、腫瘍サイズの計測を週3回行った。腫瘍容積は、 $\pi/6 \times a \times b \times c$ にて計算した (a, b, およびcは腫瘍の横径、縦径、および幅を表す)。図9に示すように、PDGF-Aアンチセンスを発現させた全ての腫瘍細胞において、腫瘍増殖の明らかな低下を認めた。なお in vitroでは、これらの細胞の増殖能に有意差はなかった。

【0078】

ヒト肺癌手術新鮮標本における、PDGF-AとVEGFのmRNA発現の相関をリアルタイムPCRに

より調べた。具体的には、ヒト肺癌組織・正常組織よりmRNAを逆転写および精製してcDNAを調製し (Isogen, Oligo dT primerを使用)、ABI 7000を用いてリアルタイムPCRによりPDGF-A mRNAを定量した。フォワードプライマーとして TCCACGCCACTAAGCATGTG (配列番号: 28)、リバープライマーとして TCGACCTGACTCCGAGGAAT (配列番号: 29)、Taqmanプローブ (FAM、TAMRA) として CTGCAAGACCAGGACGGTCATTTACGA (配列番号: 30) を用いた。50℃ 2分の後、96℃ 10分を行い、95℃ 15秒-60℃ 1分を40サイクル行った。結果、癌部および非癌部ともに、PDGF-A発現とVEGF発現は有意に相関することが判明した (図10)。これは、PDGF-AのオートクラインによるVEGF発現誘導システムが、正常組織のみならず、癌においても成立していることを示唆する。

【0079】

また、ヒト肺癌切除標本におけるPDGF-AA陽性率と患者予後の相関を調べた。ヒト肺癌切除標本におけるPDGF-AA発現を免疫組織化学染色により調べるため、ヒト肺癌組織切片を脱パラフィンし、PBSにて3回洗浄した。3% スキムミルクにて30分間ブロッキングを行い、1次抗体 (抗ヒトPDGF-AA抗体、60倍希釈、R&D) にて4℃で一晩反応させた。PBSで3回洗浄後、2次抗体 (ヒストファインシンプルステイン MAX PO(G)、Nichirei Corp.) にて室温、30分反応させ、DABにて発色させた。図11に示すように、PDGF-AA陽性肺癌患者の予後は、陰性患者のそれと比較して有意に低かった。これらの結果から、PDGF-Aの発現レベルの検査により、腫瘍の悪性度、患者予後を予測することが可能である。すなわち、腫瘍におけるPDGF-Aの発現を測定し、PDGF-Aの発現が検出された場合に、発現が陰性の腫瘍に比べ悪性であり、予後が不良と判断される。また、この結果はPDGF-Aの発現および/または活性の阻害が、PDGF-A陽性癌に対する抗腫瘍治療に有効であることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0080】

本発明により、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することを通して腫瘍増殖を抑制する方法が提供された。PDGF-AAによるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の活性化は、腫瘍血管形成の重要なファクターであり腫瘍を患う患者の予後と関連している。腫瘍またはその周辺組織におけるPDGF-Aの発現を阻害することによって、あるいはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することによって、腫瘍血管形成は阻害され、腫瘍の増殖を抑制することができる。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】 VEGF発現のアップレギュレーションにおけるFGF-2およびPDGF-AAの作用機構の解析結果を示す図である。(A) 組み換えFGF-2およびPDGF-AAは協同して線維芽細胞 (MRC5) および血管平滑筋細胞 (HSMC) からのVEGF分泌を増加させる。血清不含条件下で48時間プレインキュベーションした後、各細胞型をFGF-2および/またはPDGF-AAで刺激した。72時間後、培養液をELISAに供した。各群 n=3。* P<0.01。# P<0.05。

(B) MRC5細胞およびHSMCにおけるFGF-2を介したPDGFR α mRNA発現のタイムコースのノーザンブロット解析。血清不含条件下で48時間プレインキュベーションした後、各細胞型をFGF-2で刺激した。図示した時間に細胞を回収し、ノーザンブロット解析に供した。バンドを可視化し、フォトイメージャーを用いたデンシトメトリー解析に供した。2回実験を行い類似の結果を得た。

【図2】 PDGFR α -p70S6Kは、間葉系細胞におけるFGF-2を介したVEGF/HGFの持続的/2相的発現に必須であることを示す図である。(A) MRC5細胞のVEGFおよびHGF分泌に及ぼす、細胞内シグナル伝達経路の種々の阻害剤の効果。1%FBS存在下で48時間プレインキュベーションした後、種々の阻害剤の存在下または非存在下で、10 ng/mlのヒト組み換えFGF-2で細胞を刺激した。72時間後、培地をELISAに供した。各群 n=3。* P<0.01。(B) p70S6K阻害剤であるラバマイシン (RAPA) は、MRC5細胞のFGF-2を介したVEGF mRNA発現の後期フェーズを止める。1%FBS存在下で48時間プレインキュベーションした後、10 ng/mlのヒト組み換えFGF-2で細胞を刺激した。図示した時間で細胞を回収し、ノーザンブロット解析を行った。バンドを可視化し、フォトイメージ

ャーを用いたデンシトメトリー解析に供した。グラフは、トリプリケートの実験の結果を反映したVEGFの相対mRNAレベルの定量結果を示す。 $* P < 0.01$ 。(C) FGF-2を介したVEGF分泌の上昇は完全にPDGFR α に依存する。1%FBS存在下で48時間プレインキュベーションした後、抗PDGFR α 中和抗体の存在下または非存在下で、MRC5細胞を10 ng/mlのヒト組み換えFGF-2で刺激した。72時間後、培地をELISAに供した。HGF発現についても類似の結果を得た(データ非提示)。 $* P < 0.01$ 。

【図3】PDGFR α 系により媒介されるVEGFおよびHGFのアップレギュレーションは、マウス重症肢虚血におけるFGF-2遺伝子導入の治療効果に必須であることを示す図である。 $* P < 0.01$ 。 $\# P < 0.05$ 。(AおよびB) FGF-2遺伝子導入を行った場合と行わない場合のC57BL6救肢モデルマウスにおける虚血大腿筋でのPDGF-A(上パネル)およびPDGFR α (下パネル)mRNA相対発現の時間経過。肢虚血誘導術の直後に、SeV-mFGF2(10^7 plaque forming units: pfu)を筋肉内注射した。各時間に、大腿筋サンプルを調製しリアルタイムPCRに供した。データはGAPDH mRNAの各レベルで標準化し、未治療コントロールマウスから得た結果の相対発現で示した。各群はマウス4個体を含む。各時間で、コントロールウイルスベクター(SeV-luciferase)を注入した虚血マウス1または2個体をコントロールマウスとしたが、これらのマウスは肢虚血を起こしたマウスで見られた結果と同様の結果を示した(データ非提示)。(CおよびD) FGF-2遺伝子導入に続き、抗PDGF-AA中和抗体(プロトコルは図2D参照)またはRAPA(1.5 mg/kg/day、毎日腹腔内注入)で処理したC57BL6救肢モデルマウスにおける虚血大腿筋でのVEGF(上パネル)およびHGF(下パネル)mRNA相対発現の時間経過。図2Aの虚血群、および虚血+FGF-2群と同じ組織サンプルを用いた。各時間で、コントロールウイルスベクター(SeV-luciferase)を注入した虚血マウス1または2個体をコントロールマウスとしたが、虚血のみを起こしたマウスで見られた結果と同様の結果を示した(データ非提示)。(EおよびF) RAPAは、マウス肢虚血救肢モデルにおけるFGF-2を介したVEGF(上パネル)およびHGF(下パネル)蛋白質の発現を阻害する。day 0の前日からRAPA(1.5 mg/kg/day、毎日)腹腔注入を開始し、day 0で虚血術を実施した。その時に、 10^7 pfuのコントロールウイルス(SeV-luciferase)またはSeV-mFGF2を筋肉内注入した。2日後、大腿筋をELISAに供した。FGF-2遺伝子導入を介して誘導された外来性FGF-2発現は、RAPAで処理したマウスとしないマウスで違いは見られなかった(データ非提示)。

【図4】肢虚血を起こしたbalb/c nu/nuマウス(肢脱落モデル)において、抗PDGF-AA中和抗体は、RAPAと同様に、FGF-2遺伝子導入の効果を失わせることを示す図である。肢の予後を12の救肢スコアにより決定し、データをlog-rank testで解析した。抗PDGF-AA中和抗体を、ディスポーザブルの浸透圧ポンプの移入を介した腹腔への連続放出($200 \mu\text{g}/7\text{日}$)により投与した。手術による虚血誘導の直後にも、付加的に腹腔内へのボラス注入($100 \mu\text{g}$)を行った。

【図5】腫瘍増殖におけるRAPA処理の効果、およびインビボおよびインビトロでの血管新生増殖因子の発現に及ぼすRAPA処理の効果を示す図である。各腫瘍型細胞 10^6 細胞を皮下移植して7日後に、RAPA(15 mg/kg/day)または0.1 mol/Lのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)の腹腔内注入を毎日、あるいはSeV-luciferaseまたはSeV-hsPDGFR α (1×10^8 pfu/tumor)の腫瘍内注入を1回行った。 $* P < 0.01$ 。 $\# P < 0.05$ 。(A~D) SAS(ヒト口腔由来、口腔扁平上皮細胞癌)およびMH134(マウス肝細胞癌)におけるPDGF-AAを含む血管新生増殖因子のインビトロ発現パターン、およびRAPAの腫瘍抑制効果。データは、3つの独立した実験の結果を含み、それぞれの実験では2-4個体のマウスを用いた。Day 28に全体的な観察像を撮影した。矢印は腫瘍を示す。(EおよびF) ヒトPDGFR α の細胞外ドメインを発現する組み換えSeVのSASおよびMH134に対する抗腫瘍効果。細胞移植の5日後にベクター溶液 $50 \mu\text{L}$ を腫瘍内注入した。ルシフェラーゼを発現する組み換えSeVをコントロールとして用いた。

【図6】MH134(A~C)およびSAS(D)における腫瘍血流と血管新生増殖因子との関係を示す図である。(A)および(B) インビボにおける腫瘍内血流のRAPAによる減

少 (B: パネルおよびグラフ) およびマウスVEGFの比較的高い発現パターン (A)。同系 (syngenic) の腫瘍 (MH134、アスタリスク) を持つマウスへのRAPAの注入の開始から7日後に、ドップラー環流像を記録し、腫瘍サンプルをELISAに供した。Day 3の腫瘍も独立に蛋白質測定に供した (A: day 3、各群n=4)。day 7では、腫瘍のサイズは互いに有意差はなかった (B:アスタリスク)。 (C) hypoxiaが誘導するMH134細胞のVEGF発現に対するRAPAの効果は有意であるが最小限であることを示す棒グラフ。血清不含の条件で12時間培養後、新しい培地で細胞を洗い、normoxia (21% O₂) または hypoxia (2.5% O₂) の状態に暴露した。48時間後、培地をELISAに供しマウスVEGFを測定した。 (D) ヒト腫瘍型 (SAS) を担持するマウスの血管新生増殖因子の発現におけるRAPAに関連する変化。アップレギュレートされたVEGFの起源を調べるために観察した。SAS担持マウスへのRAPA注入開始の7日後、腫瘍サンプルをヒトおよびマウスVEGF特異的ELISA系に供した。

【図7】 外来的VEGF165遺伝子からのVEGF165発現に及ぼすアンチセンスヒトPDGF-A遺伝子導入の効果を示す図である。

【図8】 腫瘍細胞からの内在性VEGF165の発現に及ぼすアンチセンスヒトPDGF-A遺伝子導入の効果を示す図である。

【図9】 PDGF-Aの発現を阻害した腫瘍細胞のin vivo増殖能の低下を示す図である。

【図10】 ヒト肺癌手術新鮮標本における、PDGF-AとVEGFのmRNA発現の相関を示す図である。

【図11】 ヒト肺癌切除標本におけるPDGF-AA陽性率と患者予後の相関を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DनावेC RESEARCH INC.

<120> Method for suppressing tumor growth

<130> D3-X0311

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2797

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (839)..(1471)

<223>

<400> 1

acgcgcgcgcc	tgcggagccc	gcccgaactcc	ggcgcagccgg	gcctgcgcct	actcctcctc	60
ctcctctccc	ggcggcggt	gcggcgagg	cgccgactcg	gccttgcgcc	cgcctcagg	120
cccgcgcggg	cggcgccagcg	agggccccggg	cggcggggtgg	tggctgccag	gcggctcggc	180
cgcggggcgct	gccccggcccc	ggcgcagcggg	gggcgggagcg	cggcgccggg	gccgagggcg	240
cgccgcgggag	ggggtgctgg	gccgcgctgt	gccccggccgg	gcggcggttg	caagaggagg	300
ccggaggcgga	gcgcggggccc	ggcgggtgggc	gcgcagggcg	gctcgcagct	cgcagccggg	360
gccccggccag	gcgttcaggc	aggtgatcgg	tgtggcgggcg	gcggcgggcg	cggccccaga	420
ctcctcagg	agttcttctt	ggggctgatg	tccgcgaata	tgcagaatta	cgggccgggt	480
cgtcctgaa	gccagcgcg	ggagcgagcg	cggcgggcg	cagcaccggg	aacgcaccga	540
ggaagaagcc	cagcccccg	cctccgcccc	tccgctccc	acccctacc	cggcgggcca	600
ggaggctccc	cggctgcggc	gcgcactccc	tgtttctcct	cctcctggct	ggcgctgcct	660
gcctctcgc	actcactgct	cgcggggcgc	cgtecgccag	cctcgtgctc	cccgcgccac	720
cctcctcgg	gccgcgctcc	ctaagggatg	gtactgaatt	tcgccgccac	aggagaccgg	780

ctggagcgcgc	cgccccgcgc	ctcgccctctc	ctccgagcag	ccagcgcctc	gggacgcg	838
atg agg acc ttg gct tgc ctg ctg ctc ctc ggc tgc gga tac ctc gcc	886					
Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala						
1 5 10 15						
cat gtt ctg gcc gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtg atc gag agg	934					
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg						
20 25 30						
ctg gcc cgc agt cag atc cac agc atc cgg gac ctc cag cga ctc ctg	982					
Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu						
35 40 45						
gag ata gac tcc gta ggg agt gag gat tct ttg gac acc agc ctg aga	1030					
Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg						
50 55 60						
gct cac ggg gtc cac gcc act aag cat gtg ccc gag aag cgg ccc ctg	1078					
Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu						
65 70 75 80						
ccc att cgg agg aag aga agc atc gag gaa gct gtc ccc gct gtc tgc	1126					
Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys						
85 90 95						
aag acc agg acg gtc att tac gag att cct cgg agt cag gtc gac ccc	1174					
Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro						
100 105 110						
acg tcc gcc aac ttc ctg atc tgg ccc ccg tgc gtg gag gtg aaa cgc	1222					
Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg						
115 120 125						
tgc acc ggc tgc tgc aac acg agc agt gtc aag tgc cag ccc tcc cgc	1270					
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg						
130 135 140						
gtc cac cac cgc agc gtc aag gtg gcc aag gtg gaa tac gtc agg aag	1318					
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys						
145 150 155 160						
aag cca aaa tta aaa gaa gtc cag gtg agg tta gag gag cat ttg gag	1366					
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu						
165 170 175						
tgc gcc tgc gcg acc aca agc ctg aat ccg gat tat cgg gaa gag gac	1414					
Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp						
180 185 190						

acg gga agg cct agg gag tca ggt aaa aaa cgg aaa aga aaa agg tta	1462
Thr Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu	
195 200 205	
aaa ccc acc taagatgtga ggtgaggatg agccgcagcc ctttcctggg	1511
Lys Pro Thr	
210	
acatggatgt acatggcgtg ttacattcct gaacctacta tgtacgggtgc tttattgccca	1571
gtgtgcggtc tttgttctcc tccgtgaaaa actgtgtccg agaacactcg ggagaacaaa	1631
gagacagtgc acatttgttt aatgtgacat caaagcaagt attgtagcac tcgggtgaagc	1691
agtaagaagc ttccttgtca aaaagagaga gagagagaga gagagagaaa acaaaaccac	1751
aaatgacaaa aacaaaacgg actcacaaaa atatctaaac tcgatgagat ggagggtcgc	1811
cccgtgggat ggaagtgcag aggtctcagc agactggatt tctgtccggg tggtcacagg	1871
tgettttttg ccgaggatgc agagcctgct ttgggaacga ctccagaggg gtgctggtgg	1931
gctctgcagg gccgcagga agcaggaatg tcttggaac cgccacgcga actttagaaa	1991
ccacacctcc tcgctgtagt atttaagccc atacagaaac cttectgaga gccttaagtg	2051
gttttttttt ttgtttttgt tttgtttttt ttttttttgt tttttttttt tttttttttt	2111
tttacaccat aaagtgatta ttaagcttcc ttttactctt tggctagctt tttttttttt	2171
tttttttttt ttttttttta attatctctt ggatgacatt tacaccgata acacacaggc	2231
tgtctgtaact gtcaggacag tgcgacggta tttttcctag caagatgcaa actaatgaga	2291
tgtattaaaa taaacatggg atacctacct atgcatcatt tcctaaatgt ttctggcctt	2351
gtgtttctcc cttaccctgc tttatttggt aatttaagcc attttgaaag aactatgcgt	2411
caaccaatcg tacgccgtcc ctgcggcacc tgccccagag cccgtttgtg gctgagtgac	2471
aacttgttcc ccgcagtgca cacctagaat gctgtgttcc caccgggcac gtgagatgca	2531
ttgccgcctc tgtctgtgtt gttgggtgtgc cctgggtgccg tgggtggcggg cactccctct	2591
gctgccagtg tttggacaga acccaaatc tttatttttg gtaagatatt gtgctttacc	2651
tgtattaaaca gaaatgtgtg tgtgtgggtt gtttttttgt aaagggtgaag tttgtatgtt	2711
tacctaatat tacctgtttt gtataacctga gagcctgcta tgttcttctt ttgttgatcc	2771

<210> 2
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30
 Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
 35 40 45
 Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
 50 55 60
 Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
 100 105 110
 Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
 115 120 125
 Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
 130 135 140
 Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
 165 170 175
 Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
 180 185 190
 Thr Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
 195 200 205
 Lys Pro Thr
 210

<210> 3
<211> 2740
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (839)..(1426)
<223>

<400> 3

acgcgcgccc	tgcggagccc	gcccgaactcc	ggcgcagccgg	gcctgcgcct	actcctcctc	60
ctcctctccc	ggcggcggct	gcggcggagg	cgcgcactcg	gccttgcgcc	cgccttcagg	120
cccgcgcggg	cggcgcagcg	agggccccggg	cggcgggtgg	tggctgccag	gcggctcggc	180
cgcgggcgct	gccccggcccc	ggcgcagcgg	gggcggagcg	cggcgcgcga	gccgagggcg	240
cgcgcgggag	ggggtgctgg	gccgcgctgt	gccccggccgg	gcggcggctg	caagaggagg	300
ccggaggcga	gcgcggggcc	ggcgggtgggc	gcgcagggcg	gctcgcagct	cgcagccggg	360
gccccggccag	gcgttcaggc	aggtgatcgg	tgtggcggcg	gcggcggcgg	cggccccaga	420
ctccctcggg	agttcttctt	ggggctgatg	tccgcaaata	tgcagaatta	cgggccgggt	480
cgtcctgaa	gccagcgcgg	ggagcgcg	cggcggcggc	cagcacccgg	aacgcaccga	540
ggaagaagcc	cagccccgcg	cctccgcccc	tcccgctccc	acccctacc	cggcggccca	600
ggaggctccc	cggctgcggc	gcgcactccc	tgtttctcct	cctcctggct	ggcgtgcct	660
gcctctccgc	actcactget	cgcgcggcgc	cgtccgccag	ctcgtgctc	cccgcgccac	720
cctcctcggg	gccgcgcctc	ctaagggatg	gtactgaatt	tcgccgccac	aggagaccgg	780
ctggagcgcc	cgccccgcgc	ctcgctctc	ctccgagcag	ccagcgctc	gggacgcg	838
atg agg acc ttg gct tgc ctg ctg ctc ctc ggc tgc gga tac ctc gcc	886					
Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala						
1 5 10 15						
cat gtt ctg gcc gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtg atc gag agg	934					
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg						
20 25 30						
ctg gcc cgc agt cag atc cac agc atc cgg gac ctc cag cga ctc ctg	982					

Leu	Ala	Arg	Ser	Gln	Ile	His	Ser	Ile	Arg	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu		
		35					40					45					
gag	ata	gac	tcc	gta	ggg	agt	gag	gat	tct	ttg	gac	acc	agc	ctg	aga	1030	
Glu	Ile	Asp	Ser	Val	Gly	Ser	Glu	Asp	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Arg		
	50					55					60						
gct	cac	ggg	gtc	cac	gcc	act	aag	cat	gtg	ccc	gag	aag	cgg	ccc	ctg	1078	
Ala	His	Gly	Val	His	Ala	Thr	Lys	His	Val	Pro	Glu	Lys	Arg	Pro	Leu		
65					70				75						80		
ccc	att	cgg	agg	aag	aga	agc	atc	gag	gaa	gct	gtc	ccc	gct	gtc	tgc	1126	
Pro	Ile	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Ile	Glu	Glu	Ala	Val	Pro	Ala	Val	Cys		
				85				90						95			
aag	acc	agg	acg	gtc	att	tac	gag	att	cct	cgg	agt	cag	gtc	gac	ccc	1174	
Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Ile	Tyr	Glu	Ile	Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Asp	Pro		
			100					105					110				
acg	tcc	gcc	aac	ttc	ctg	atc	tgg	ccc	ccg	tgc	gtg	gag	gtg	aaa	cgc	1222	
Thr	Ser	Ala	Asn	Phe	Leu	Ile	Trp	Pro	Pro	Cys	Val	Glu	Val	Lys	Arg		
		115					120					125					
tgc	acc	ggc	tgc	tgc	aac	acg	agc	agt	gtc	aag	tgc	cag	ccc	tcc	cgc	1270	
Cys	Thr	Gly	Cys	Cys	Asn	Thr	Ser	Ser	Val	Lys	Cys	Gln	Pro	Ser	Arg		
	130					135					140						
gtc	cac	cac	cgc	agc	gtc	aag	gtg	gcc	aag	gtg	gaa	tac	gtc	agg	aag	1318	
Val	His	His	Arg	Ser	Val	Lys	Val	Ala	Lys	Val	Glu	Tyr	Val	Arg	Lys		
145					150					155					160		
aag	cca	aaa	tta	aaa	gaa	gtc	cag	gtg	agg	tta	gag	gag	cat	ttg	gag	1366	
Lys	Pro	Lys	Leu	Lys	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Leu	Glu	Glu	His	Leu	Glu		
				165				170						175			
tgc	gcc	tgc	gcg	acc	aca	agc	ctg	aat	ccg	gat	tat	cgg	gaa	gag	gac	1414	
Cys	Ala	Cys	Ala	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Pro	Asp	Tyr	Arg	Glu	Glu	Asp		
			180					185					190				
acg	gat	gtg	agg	tgagg	atgag	ccgcag	ccct	ttcct	ggg	ac	atgg	atgtac				1466	
Thr	Asp	Val	Arg														
	195																
atggcg	tgtt	acatt	cctga	accta	ctatg	tacgg	tgc	tt	tattg	ccagt	gtgc	gg	tctt			1526	
tg	ttctc	ctc	cgtg	aaaaa	c	tg	tgtcc	gag	aac	actc	ggg	aga	a	caa	aga	gacagtgcac	1586
att	tgt	tttaa	tgtg	acatca	aag	caag	tat	tgt	agc	actc	gg	tga	a	gcag	taaga	aagctt	1646
cc	ttgtc	aaa	aag	agagaga	gag	agagaga	gag	agagaaa	c	aaa	acc	acaa	atg	acaaaaa		1706	

caaaacggac	tcacaaaaat	atctaaactc	gatgagatgg	agggtcgccc	cgtgggatgg	1766
aagtgcagag	gtctcagcag	actggatttc	tgtccgggtg	gtcacagggtg	cttttttggc	1826
gaggatgcag	agcctgcctt	gggaacgact	ccagaggggt	gctggtgggc	tctgcagggc	1886
ccgcaggaag	caggaatgtc	ttggaaaaccg	ccacgcgaac	tttagaaacc	acacctcctc	1946
gctgtagtat	ttaagcccat	acagaaaacct	tcctgagagc	cttaagtgggt	tttttttttt	2006
gtttttgttt	tgtttttttt	ttttttgttt	tttttttttt	tttttttttt	tacaccataa	2066
agtgattatt	aagcttcctt	ttactctttg	gctagctttt	tttttttttt	tttttttttt	2126
tttttttaat	tatctcttgg	atgacattta	caccgataac	acacaggctg	ctgtaactgt	2186
caggacagtg	cgacgggtatt	tttcctagca	agatgcaaac	taatgagatg	tattaaaata	2246
aacatgggtat	acctacctat	gcatcatttc	ctaaatgttt	ctggcctttgt	gtttctccct	2306
tacctgctt	tatttggtta	tttaagccat	tttgaaagaa	ctatgcgtca	accaatcgta	2366
cgccgtccct	gcggcacctg	ccccagagcc	cgtttggtggc	tgagtgacaa	cttgttcccc	2426
gcagtgcaca	cctagaatgc	tgtgttccca	cgccggcacgt	gagatgcatt	gccgcttctg	2486
tctgtgttgt	tgggtgtgcc	tgggtgccgtg	gtggcgggtca	ctccctctgc	tgccagtgtt	2546
tggacagaac	ccaaattctt	tattttttgt	aagatatgtt	gctttacctg	tattaacaga	2606
aatgtgtgtg	tgtgggttgt	ttttttgtaa	agggtgaagtt	tgtatgttta	cctaataatta	2666
cctgttttgt	atacctgaga	gcctgctatg	ttcttctttt	gttgatccaa	aattaaaaaa	2726
aaaataccac	caac					2740

<210> 4
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
 20 25 30

Leu	Ala	Arg	Ser	Gln	Ile	His	Ser	Ile	Arg	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Glu	Ile	Asp	Ser	Val	Gly	Ser	Glu	Asp	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Arg
	50					55					60				
Ala	His	Gly	Val	His	Ala	Thr	Lys	His	Val	Pro	Glu	Lys	Arg	Pro	Leu
65					70					75					80
Pro	Ile	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Ile	Glu	Glu	Ala	Val	Pro	Ala	Val	Cys
				85					90					95	
Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Ile	Tyr	Glu	Ile	Pro	Arg	Ser	Gln	Val	Asp	Pro
			100					105					110		
Thr	Ser	Ala	Asn	Phe	Leu	Ile	Trp	Pro	Pro	Cys	Val	Glu	Val	Lys	Arg
		115					120					125			
Cys	Thr	Gly	Cys	Cys	Asn	Thr	Ser	Ser	Val	Lys	Cys	Gln	Pro	Ser	Arg
	130					135					140				
Val	His	His	Arg	Ser	Val	Lys	Val	Ala	Lys	Val	Glu	Tyr	Val	Arg	Lys
145					150					155					160
Lys	Pro	Lys	Leu	Lys	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Leu	Glu	Glu	His	Leu	Glu
				165					170					175	
Cys	Ala	Cys	Ala	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Pro	Asp	Tyr	Arg	Glu	Glu	Asp
			180					185					190		
Thr	Asp	Val	Arg												
		195													

<210> 5
 <211> 6633
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (395)..(3661)
 <223>

<400> 5
 ttctccccgc cccccagttg ttgtcgaagt ctggggggtg ggactggacc ccctgattgc 60

 gtaagagcaa aaagcgaagg cgcaatctgg acactgggag attcggagcg cagggagttt 120

 gagagaaact tttattttga agagaccaag gttgaggggg ggcttatttc ctgacagcta 180

tttacttaga gcaaattgatt agtttttagaa ggatggacta taacattgaa tcaattacaa	240
aacgcgggttt ttgagcccat tactgttggga gctacaggga gagaaacagg aggagactgc	300
aagagatcat ttgggaaggc cgtgggcacg ctctttactc catgtgtggg acattcattg	360
cggaataaca tcggaggaga agtttcccag agct atg ggg act tcc cat ccg gcg	415
Met Gly Thr Ser His Pro Ala	
1 5	
ttc ctg gtc tta ggc tgt ctt ctc aca ggg ctg agc cta atc ctc tgc	463
Phe Leu Val Leu Gly Cys Leu Leu Thr Gly Leu Ser Leu Ile Leu Cys	
10 15 20	
cag ctt tca tta ccc tct atc ctt cca aat gaa aat gaa aag gtt gtg	511
Gln Leu Ser Leu Pro Ser Ile Leu Pro Asn Glu Asn Glu Lys Val Val	
25 30 35	
cag ctg aat tca tcc ttt tct ctg aga tgc ttt ggg gag agt gaa gtg	559
Gln Leu Asn Ser Ser Phe Ser Leu Arg Cys Phe Gly Glu Ser Glu Val	
40 45 50 55	
agc tgg cag tac ccc atg tct gaa gaa gag agc tcc gat gtg gaa atc	607
Ser Trp Gln Tyr Pro Met Ser Glu Glu Glu Ser Ser Asp Val Glu Ile	
60 65 70	
aga aat gaa gaa aac aac agc ggc ctt ttt gtg acg gtc ttg gaa gtg	655
Arg Asn Glu Glu Asn Asn Ser Gly Leu Phe Val Thr Val Leu Glu Val	
75 80 85	
agc agt gcc tcg gcg gcc cac aca ggg ttg tac act tgc tat tac aac	703
Ser Ser Ala Ser Ala Ala His Thr Gly Leu Tyr Thr Cys Tyr Tyr Asn	
90 95 100	
cac act cag aca gaa gag aat gag ctt gaa ggc agg cac att tac atc	751
His Thr Gln Thr Glu Glu Asn Glu Leu Glu Gly Arg His Ile Tyr Ile	
105 110 115	
tat gtg cca gac cca gat gta gcc ttt gta cct cta gga atg acg gat	799
Tyr Val Pro Asp Pro Asp Val Ala Phe Val Pro Leu Gly Met Thr Asp	
120 125 130 135	
tat tta gtc atc gtg gag gat gat gat tct gcc att ata cct tgt cgc	847
Tyr Leu Val Ile Val Glu Asp Asp Asp Ser Ala Ile Ile Pro Cys Arg	
140 145 150	
aca act gat ccc gag act cct gta acc tta cac aac agt gag ggg gtg	895
Thr Thr Asp Pro Glu Thr Pro Val Thr Leu His Asn Ser Glu Gly Val	
155 160 165	

gta cct gcc tcc tac gac agc aga cag ggc ttt aat ggg acc ttc act	943
Val Pro Ala Ser Tyr Asp Ser Arg Gln Gly Phe Asn Gly Thr Phe Thr	
170 175 180	
gta ggg ccc tat atc tgt gag gcc acc gtc aaa gga aag aag ttc cag	991
Val Gly Pro Tyr Ile Cys Glu Ala Thr Val Lys Gly Lys Lys Phe Gln	
185 190 195	
acc atc cca ttt aat gtt tat gct tta aaa gca aca tca gag ctg gat	1039
Thr Ile Pro Phe Asn Val Tyr Ala Leu Lys Ala Thr Ser Glu Leu Asp	
200 205 210 215	
cta gaa atg gaa gct ctt aaa acc gtg tat aag tca ggg gaa acg att	1087
Leu Glu Met Glu Ala Leu Lys Thr Val Tyr Lys Ser Gly Glu Thr Ile	
220 225 230	
gtg gtc acc tgt gct gtt ttt aac aat gag gtg gtt gac ctt caa tgg	1135
Val Val Thr Cys Ala Val Phe Asn Asn Glu Val Val Asp Leu Gln Trp	
235 240 245	
act tac cct gga gaa gtg aaa ggc aaa ggc atc aca atg ctg gaa gaa	1183
Thr Tyr Pro Gly Glu Val Lys Gly Lys Gly Ile Thr Met Leu Glu Glu	
250 255 260	
atc aaa gtc cca tcc atc aaa ttg gtg tac act ttg acg gtc ccc gag	1231
Ile Lys Val Pro Ser Ile Lys Leu Val Tyr Thr Leu Thr Val Pro Glu	
265 270 275	
gcc acg gtg aaa gac agt gga gat tac gaa tgt gct gcc cgc cag gct	1279
Ala Thr Val Lys Asp Ser Gly Asp Tyr Glu Cys Ala Ala Arg Gln Ala	
280 285 290 295	
acc agg gag gtc aaa gaa atg aag aaa gtc act att tct gtc cat gag	1327
Thr Arg Glu Val Lys Glu Met Lys Lys Val Thr Ile Ser Val His Glu	
300 305 310	
aaa ggt ttc att gaa atc aaa ccc acc ttc agc cag ttg gaa gct gtc	1375
Lys Gly Phe Ile Glu Ile Lys Pro Thr Phe Ser Gln Leu Glu Ala Val	
315 320 325	
aac ctg cat gaa gtc aaa cat ttt gtt gta gag gtg cgg gcc tac cca	1423
Asn Leu His Glu Val Lys His Phe Val Val Glu Val Arg Ala Tyr Pro	
330 335 340	
cct ccc agg ata tcc tgg ctg aaa aac aat ctg act ctg att gaa aat	1471
Pro Pro Arg Ile Ser Trp Leu Lys Asn Asn Leu Thr Leu Ile Glu Asn	
345 350 355	
ctc act gag atc acc act gat gtg gaa aag att cag gaa ata agg tat	1519

Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Thr	Asp	Val	Glu	Lys	Ile	Gln	Glu	Ile	Arg	Tyr	
360					365					370					375	
cga	agc	aaa	tta	aag	ctg	atc	cgt	gct	aag	gaa	gaa	gac	agt	ggc	cat	1567
Arg	Ser	Lys	Leu	Lys	Leu	Ile	Arg	Ala	Lys	Glu	Glu	Asp	Ser	Gly	His	
				380					385					390		
tat	act	att	gta	gct	caa	aat	gaa	gat	gct	gtg	aag	agc	tat	act	ttt	1615
Tyr	Thr	Ile	Val	Ala	Gln	Asn	Glu	Asp	Ala	Val	Lys	Ser	Tyr	Thr	Phe	
			395					400					405			
gaa	ctg	tta	act	caa	gtt	cct	tca	tcc	att	ctg	gac	ttg	gtc	gat	gat	1663
Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Ser	Ser	Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Asp	
		410					415					420				
cac	cat	ggc	tca	act	ggg	gga	cag	acg	gtg	agg	tgc	aca	gct	gaa	ggc	1711
His	His	Gly	Ser	Thr	Gly	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	
	425					430				435						
acg	ccg	ctt	cct	gat	att	gag	tgg	atg	ata	tgc	aaa	gat	att	aag	aaa	1759
Thr	Pro	Leu	Pro	Asp	Ile	Glu	Trp	Met	Ile	Cys	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	
440					445					450					455	
tgt	aat	aat	gaa	act	tcc	tgg	act	att	ttg	gcc	aac	aat	gtc	tca	aac	1807
Cys	Asn	Asn	Glu	Thr	Ser	Trp	Thr	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Val	Ser	Asn	
				460					465					470		
atc	atc	acg	gag	atc	cac	tcc	cga	gac	agg	agt	acc	gtg	gag	ggc	cgt	1855
Ile	Ile	Thr	Glu	Ile	His	Ser	Arg	Asp	Arg	Ser	Thr	Val	Glu	Gly	Arg	
			475					480					485			
gtg	act	ttc	gcc	aaa	gtg	gag	gag	acc	atc	gcc	gtg	cga	tgc	ctg	gct	1903
Val	Thr	Phe	Ala	Lys	Val	Glu	Glu	Thr	Ile	Ala	Val	Arg	Cys	Leu	Ala	
		490					495					500				
aag	aat	ctc	ctt	gga	gct	gag	aac	cga	gag	ctg	aag	ctg	gtg	gct	ccc	1951
Lys	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Glu	Asn	Arg	Glu	Leu	Lys	Leu	Val	Ala	Pro	
	505					510					515					
acc	ctg	cgt	tct	gaa	ctc	acg	gtg	gct	gct	gca	gtc	ctg	gtg	ctg	ttg	1999
Thr	Leu	Arg	Ser	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Val	Leu	Leu	
520					525					530					535	
gtg	att	gtg	atc	atc	tca	ctt	att	gtc	ctg	gtt	gtc	att	tgg	aaa	cag	2047
Val	Ile	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Val	Val	Ile	Trp	Lys	Gln	
				540					545					550		
aaa	ccg	agg	tat	gaa	att	cgc	tgg	agg	gtc	att	gaa	tca	atc	agc	ccg	2095
Lys	Pro	Arg	Tyr	Glu	Ile	Arg	Trp	Arg	Val	Ile	Glu	Ser	Ile	Ser	Pro	
			555					560					565			

gat gga cat gaa tat att tat gtg gac ccg atg cag ctg cct tat gac	2143
Asp Gly His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp	
570 575 580	
tca aga tgg gag ttt cca aga gat gga cta gtg ctt ggt cgg gtc ttg	2191
Ser Arg Trp Glu Phe Pro Arg Asp Gly Leu Val Leu Gly Arg Val Leu	
585 590 595	
ggg tct gga gcg ttt ggg aag gtg gtt gaa gga aca gcc tat gga tta	2239
Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Gly Thr Ala Tyr Gly Leu	
600 605 610 615	
agc cgg tcc caa cct gtc atg aaa gtt gca gtg aag atg cta aaa ccc	2287
Ser Arg Ser Gln Pro Val Met Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Pro	
620 625 630	
acg gcc aga tcc agt gaa aaa caa gct ctc atg tct gaa ctg aag ata	2335
Thr Ala Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile	
635 640 645	
atg act cac ctg ggg cca cat ttg aac att gta aac ttg ctg gga gcc	2383
Met Thr His Leu Gly Pro His Leu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala	
650 655 660	
tgc acc aag tca ggc ccc att tac atc atc aca gag tat tgc ttc tat	2431
Cys Thr Lys Ser Gly Pro Ile Tyr Ile Ile Thr Glu Tyr Cys Phe Tyr	
665 670 675	
gga gat ttg gtc aac tat ttg cat aag aat agg gat agc ttc ctg agc	2479
Gly Asp Leu Val Asn Tyr Leu His Lys Asn Arg Asp Ser Phe Leu Ser	
680 685 690 695	
cac cac cca gag aag cca aag aaa gag ctg gat atc ttt gga ttg aac	2527
His His Pro Glu Lys Pro Lys Lys Glu Leu Asp Ile Phe Gly Leu Asn	
700 705 710	
cct gct gat gaa agc aca cgg agc tat gtt att tta tct ttt gaa aac	2575
Pro Ala Asp Glu Ser Thr Arg Ser Tyr Val Ile Leu Ser Phe Glu Asn	
715 720 725	
aat ggt gac tac atg gac atg aag cag gct gat act aca cag tat gtc	2623
Asn Gly Asp Tyr Met Asp Met Lys Gln Ala Asp Thr Thr Gln Tyr Val	
730 735 740	
ccc atg cta gaa agg aaa gag gtt tct aaa tat tcc gac atc cag aga	2671
Pro Met Leu Glu Arg Lys Glu Val Ser Lys Tyr Ser Asp Ile Gln Arg	
745 750 755	
tca ctc tat gat cgt cca gcc tca tat aag aag aaa tct atg tta gac	2719

Ser 760	Leu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Tyr	Lys	Lys	Lys	Ser	Met	Leu	Asp 775	
					765					770						
tca	gaa	gtc	aaa	aac	ctc	ctt	tca	gat	gat	aac	tca	gaa	ggc	ctt	act	2767
Ser	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	Leu	Ser	Asp	Asp	Asn	Ser	Glu	Gly	Leu	Thr	
				780					785					790		
tta	ttg	gat	ttg	ttg	agc	ttc	acc	tat	caa	gtt	gcc	cga	gga	atg	gag	2815
Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Phe	Thr	Tyr	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	
			795					800					805			
ttt	ttg	gct	tca	aaa	aat	tgt	gtc	cac	cgt	gat	ctg	gct	gct	cgc	aac	2863
Phe	Leu	Ala	Ser	Lys	Asn	Cys	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	
		810					815					820				
gtc	ctc	ctg	gca	caa	gga	aaa	att	gtg	aag	atc	tgt	gac	ttt	ggc	ctg	2911
Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Lys	Ile	Val	Lys	Ile	Cys	Asp	Phe	Gly	Leu	
	825					830				835						
gcc	aga	gac	atc	atg	cat	gat	tcg	aac	tat	gtg	tcg	aaa	ggc	agt	acc	2959
Ala	Arg	Asp	Ile	Met	His	Asp	Ser	Asn	Tyr	Val	Ser	Lys	Gly	Ser	Thr	
840					845					850					855	
ttt	ctg	ccc	gtg	aag	tgg	atg	gct	cct	gag	agc	atc	ttt	gac	aac	ctc	3007
Phe	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Phe	Asp	Asn	Leu	
				860					865					870		
tac	acc	aca	ctg	agt	gat	gtc	tgg	tct	tat	ggc	att	ctg	ctc	tgg	gag	3055
Tyr	Thr	Thr	Leu	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Leu	Leu	Trp	Glu	
			875					880					885			
atc	ttt	tcc	ctt	ggc	ggc	acc	cct	tac	ccc	ggc	atg	atg	gtg	gat	tct	3103
Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly	Met	Met	Val	Asp	Ser	
		890					895					900				
act	ttc	tac	aat	aag	atc	aag	agt	ggg	tac	cgg	atg	gcc	aag	cct	gac	3151
Thr	Phe	Tyr	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Gly	Tyr	Arg	Met	Ala	Lys	Pro	Asp	
	905					910					915					
cac	gct	acc	agt	gaa	gtc	tac	gag	atc	atg	gtg	aaa	tgc	tgg	aac	agt	3199
His	Ala	Thr	Ser	Glu	Val	Tyr	Glu	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Asn	Ser	
920					925					930					935	
gag	ccg	gag	aag	aga	ccc	tcc	ttt	tac	cac	ctg	agt	gag	att	gtg	gag	3247
Glu	Pro	Glu	Lys	Arg	Pro	Ser	Phe	Tyr	His	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Glu	
				940					945					950		
aat	ctg	ctg	cct	gga	caa	tat	aaa	aag	agt	tat	gaa	aaa	att	cac	ctg	3295
Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Gln	Tyr	Lys	Lys	Ser	Tyr	Glu	Lys	Ile	His	Leu	
			955					960					965			

gac ttc ctg aag agt gac cat cct gct gtg gca cgc atg cgt gtg gac	3343
Asp Phe Leu Lys Ser Asp His Pro Ala Val Ala Arg Met Arg Val Asp	
970 975 980	
tca gac aat gca tac att ggt gtc acc tac aaa aac gag gaa gac aag	3391
Ser Asp Asn Ala Tyr Ile Gly Val Thr Tyr Lys Asn Glu Glu Asp Lys	
985 990 995	
ctg aag gac tgg gag ggt ggt ctg gat gag cag aga ctg agc gct	3436
Leu Lys Asp Trp Glu Gly Gly Leu Asp Glu Gln Arg Leu Ser Ala	
1000 1005 1010	
gac agt ggc tac atc att cct ctg cct gac att gac cct gtc cct	3481
Asp Ser Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Pro Asp Ile Asp Pro Val Pro	
1015 1020 1025	
gag gag gag gac ctg ggc aag agg aac aga cac agc tcg cag acc	3526
Glu Glu Glu Asp Leu Gly Lys Arg Asn Arg His Ser Ser Gln Thr	
1030 1035 1040	
tct gaa gag agt gcc att gag acg ggt tcc agc agt tcc acc ttc	3571
Ser Glu Glu Ser Ala Ile Glu Thr Gly Ser Ser Ser Ser Thr Phe	
1045 1050 1055	
atc aag aga gag gac gag acc att gaa gac atc gac atg atg gac	3616
Ile Lys Arg Glu Asp Glu Thr Ile Glu Asp Ile Asp Met Met Asp	
1060 1065 1070	
gac atc ggc ata gac tct tca gac ctg gtg gaa gac agc ttc ctg	3661
Asp Ile Gly Ile Asp Ser Ser Asp Leu Val Glu Asp Ser Phe Leu	
1075 1080 1085	
taactggcgg attcgagggg ttccttccac ttctggggcc acctctggat cccgttcaga	3721
aaaaccacttt attgcaatgc ggaggttgag aggaggactt ggttgatggt taaagagaag	3781
ttcccagcca agggcctcgg ggagcgttct aaatatgaat gaatgggata ttttgaaatg	3841
aactttgtca gtgttgccctc tcgcaatgcc tcagtagcat ctcagtgggtg tgtgaagttt	3901
ggagatagat ggataagggga ataataggcc acagaagggtg aactttgtgc ttcaaggaca	3961
ttggtgagag tccaacagac acaatttata ctgcgacaga acttcagcat tgtaattatg	4021
taaataactc taaccaaggc tgtgtttaga ttgtattaac tatcttcttt ggacttctga	4081
agagaccact caatccatcc atgtacttcc ctcttgaaac ctgatgtcag ctgctgttga	4141
actttttaaa gaagtgcatt aaaaaccatt tttgaacctt aaaagggtact ggtactatag	4201

cat t t t t g c t a	t c t t t t t t a g	t g t t a a g a g a	t a a a g a a t a a	t a a t t a a c c a	a c c t t g t t t a	4261
a t a g a t t t g g	g t c a t t t a g a	a g c c t g a c a a	c t c a t t t t c a	t a t t g t a a t c	t a t g t t t a t a	4321
a t a c t a c t a c	t g t t a t c a g t	a a t g c t a a a t	g t g t a a t a a t	g t a a c a t g a t	t t c c c t c c a g	4381
a g a a a g c a c a	a t t t a a a a c a	a t c c t t a c t a	a g t a g g t g a t	g a g t t t g a c a	g t t t t t g a c a	4441
t t t a t a t t a a	a t a a c a t g t t	t c t c t a t a a a	g t a t g g t a a t	a g c t t t a g t g	a a t t a a a t t t	4501
a g t t g a g c a t	a g a g a a c a a a	g t a a a a g t a g	t g t t g t c c a g	g a a g t c a g a a	t t t t t a a c t g	4561
t a c t g a a t a g	g t t c c c c a a t	c c a t c g t a t t	a a a a a a c a a t	t a a c t g c c c t	c t g a a a t a a t	4621
g g g a t t a g a a	a c a a a c a a a a	c t c t t a a g t c	c t a a a a g t t c	t c a a t g t a g a	g g c a t a a a c c	4681
t g t g c t g a a c	a t a a c t t c t c	a t g t a t a t t a	c c c a a t g g a a	a a t a t a a t g a	t c a g c a a a a a	4741
g a c t g g a t t t	g c a g a a g t t t	t t t t t t t t t t	t c t t c a t g c c	t g a t g a a a g c	t t t g g c a a c c	4801
c c a a t a t a t g	t a t t t t t t g a	a t c t a t g a a c	c t g a a a a g g g	t c a g a a g g a t	g c c c a g a c a t	4861
c a g c c t c c t t	c t t t c a c c c c	t t a c c c c a a a	g a g a a a g a g t	t t g a a a c t c g	a g a c c a t a a a	4921
g a t a t t c t t t	a g t g g a g g c t	g g a t g t g c a t	t a g c c t g g a t	c c t c a g t t c t	c a a a t g t g t g	4981
t g g c a g c c a g	g a t g a c t a g a	t c c t g g g t t t	c c a t c c t t g a	g a t t c t g a a g	t a t g a a g t c t	5041
g a g g g a a a c c	a g a g t c t g t a	t t t t t c t a a a	c t c c c t g g c t	g t t c t g a t c g	g c c a g t t t t c	5101
g g a a a c a c t g	a c t t a g g t t t	c a g g a a g t t g	c c a t g g g a a a	c a a a t a a t t t	g a a c t t t g g a	5161
a c a g g g t t g g	a a t t c a a c c a	c g c a g g a a g c	c t a c t a t t t a	a a t c c t t g g c	t t c a g g t t a g	5221
t g a c a t t t a a	t g c c a t c t a g	c t a g c a a t t g	c g a c c t t a a t	t t a a c t t t c c	a g t c t t a g c t	5281
g a g g c t g a g a	a a g c t a a a g t	t t g g t t t t g a	c a g g t t t t c c	a a a a g t a a a g	a t g c t a c t t c	5341
c c a c t g t a t g	g g g g a g a t t g	a a c t t t c c c c	g t c t c c c g t c	t t c t g c c t c c	c a c t c c a t a c	5401
c c c g c c a a g g	a a a g g c a t g t	a c a a a a a t t a	t g c a a t t c a g	t g t t c c a a g t	c t c t g t g t a a	5461
c c a g c t c a g t	g t t t t g g t g g	a a a a a a c a t t	t t a a g t t t t a	c t g a t a a t t t	g a g g t t a g a t	5521
g g g a g g a t g a	a t t g t c a c a t	c t a t c c a c a c	t g t c a a a c a g	g t t g g t g t g g	g t t c a t t g g c	5581
a t t c t t t g c a	a t a c t g c t t a	a t t g c t g a t a	c c a t a t g a a t	g a a a c a t g g g	c t g t g a t t a c	5641
t g c a a t c a c t	g t g c t a t c g g	c a g a t g a t g c	t t t g g a a g a t	g c a g a a g c a a	t a a t a a a g t a	5701

cttgactacc tactgggtgta atctcaatgc aagccccaac tttcttatcc aactttttca 5761
 tagtaagtgc gaagactgag ccagattggc caattaaaaa cgaaaacctg actaggttct 5821
 gtagagccaa ttagacttga aatacgtttg tgtttctaga atcacagctc aagcattctg 5881
 tttatcgctc actctccctt gtacagcctt attttgttgg tgccttgcat tttgatattg 5941
 ctgtgagcct tgcattgacat catgaggccg gatgaaactt ctcagtccag cagtttccag 6001
 tcctaacaaa tgctcccacc tgaatttgta tatgactgca tttgtgggtg tgtgtgtgtt 6061
 ttcagcaaat tccagatttg tttccttttg gcctcctgca aagtctccag aagaaaaattt 6121
 gccaatcttt cctactttct atttttatga tgacaatcaa agccggcctg agaaacacta 6181
 tttgtgactt tttaaacgat tagtgatgtc cttaaaatgt ggtctgccaa tctgtacaaa 6241
 atggtcctat ttttgtgaag agggacataa gataaaatga tgttatacat caatatgtat 6301
 atatgtattt ctatatagac ttggagaata ctgccaaaac atttatgaca agctgtatca 6361
 ctgccttcgt ttatatTTTT ttaactgtga taatccccac aggcacatta actgttgcac 6421
 ttttgaatgt ccaaaattta tatttttagaa ataataaaaa gaaagatact tacatgttcc 6481
 caaaacaatg gtgtgggtgaa tgtgtgagaa aaactaactt gatagggtct accaatacaa 6541
 aatgtattac gaatgccctt gttcattgtt ttgtttttaa acgtgtaaat gaagatcttt 6601
 atatttcaat aaatgatata taatttaaag tt 6633

<210> 6
 <211> 1089
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Gly Thr Ser His Pro Ala Phe Leu Val Leu Gly Cys Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Leu Ser Leu Ile Leu Cys Gln Leu Ser Leu Pro Ser Ile Leu Pro
 20 25 30
 Asn Glu Asn Glu Lys Val Val Gln Leu Asn Ser Ser Phe Ser Leu Arg
 35 40 45
 Cys Phe Gly Glu Ser Glu Val Ser Trp Gln Tyr Pro Met Ser Glu Glu

50					55					60					
Glu	Ser	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Arg	Asn	Glu	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly	Leu
65					70					75					80
Phe	Val	Thr	Val	Leu	Glu	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	His	Thr	Gly
				85					90					95	
Leu	Tyr	Thr	Cys	Tyr	Tyr	Asn	His	Thr	Gln	Thr	Glu	Glu	Asn	Glu	Leu
			100					105					110		
Glu	Gly	Arg	His	Ile	Tyr	Ile	Tyr	Val	Pro	Asp	Pro	Asp	Val	Ala	Phe
		115					120					125			
Val	Pro	Leu	Gly	Met	Thr	Asp	Tyr	Leu	Val	Ile	Val	Glu	Asp	Asp	Asp
	130					135					140				
Ser	Ala	Ile	Ile	Pro	Cys	Arg	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Leu	His	Asn	Ser	Glu	Gly	Val	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asp	Ser	Arg	Gln
				165					170					175	
Gly	Phe	Asn	Gly	Thr	Phe	Thr	Val	Gly	Pro	Tyr	Ile	Cys	Glu	Ala	Thr
			180					185					190		
Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	Gln	Thr	Ile	Pro	Phe	Asn	Val	Tyr	Ala	Leu
		195					200					205			
Lys	Ala	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Leu	Glu	Met	Glu	Ala	Leu	Lys	Thr	Val
	210					215					220				
Tyr	Lys	Ser	Gly	Glu	Thr	Ile	Val	Val	Thr	Cys	Ala	Val	Phe	Asn	Asn
225						230					235				240
Glu	Val	Val	Asp	Leu	Gln	Trp	Thr	Tyr	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Gly	Lys
			245						250					255	
Gly	Ile	Thr	Met	Leu	Glu	Glu	Ile	Lys	Val	Pro	Ser	Ile	Lys	Leu	Val
			260					265					270		
Tyr	Thr	Leu	Thr	Val	Pro	Glu	Ala	Thr	Val	Lys	Asp	Ser	Gly	Asp	Tyr
		275					280					285			
Glu	Cys	Ala	Ala	Arg	Gln	Ala	Thr	Arg	Glu	Val	Lys	Glu	Met	Lys	Lys
	290					295					300				
Val	Thr	Ile	Ser	Val	His	Glu	Lys	Gly	Phe	Ile	Glu	Ile	Lys	Pro	Thr
305						310					315				320

Phe	Ser	Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Leu	His	Glu	Val	Lys	His	Phe	Val	
				325					330					335		
Val	Glu	Val	Arg	Ala	Tyr	Pro	Pro	Pro	Arg	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	
			340					345					350			
Asn	Leu	Thr	Leu	Ile	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Thr	Asp	Val	Glu	
		355					360					365				
Lys	Ile	Gln	Glu	Ile	Arg	Tyr	Arg	Ser	Lys	Leu	Lys	Leu	Ile	Arg	Ala	
	370					375					380					
Lys	Glu	Glu	Asp	Ser	Gly	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Ala	Gln	Asn	Glu	Asp	
385					390					395					400	
Ala	Val	Lys	Ser	Tyr	Thr	Phe	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Ser	Ser	
				405					410					415		
Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Asp	His	His	Gly	Ser	Thr	Gly	Gly	Gln	Thr	
			420					425					430			
Val	Arg	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Pro	Leu	Pro	Asp	Ile	Glu	Trp	Met	
		435					440					445				
Ile	Cys	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Cys	Asn	Asn	Glu	Thr	Ser	Trp	Thr	Ile	
	450					455					460					
Leu	Ala	Asn	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Ile	Thr	Glu	Ile	His	Ser	Arg	Asp	
465					470					475					480	
Arg	Ser	Thr	Val	Glu	Gly	Arg	Val	Thr	Phe	Ala	Lys	Val	Glu	Glu	Thr	
				485					490					495		
Ile	Ala	Val	Arg	Cys	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Glu	Asn	Arg	
			500					505					510			
Glu	Leu	Lys	Leu	Val	Ala	Pro	Thr	Leu	Arg	Ser	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	
		515					520					525				
Ala	Ala	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Ile	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Ile	Val	
	530					535					540					
Leu	Val	Val	Ile	Trp	Lys	Gln	Lys	Pro	Arg	Tyr	Glu	Ile	Arg	Trp	Arg	
545					550					555					560	
Val	Ile	Glu	Ser	Ile	Ser	Pro	Asp	Gly	His	Glu	Tyr	Ile	Tyr	Val	Asp	
				565					570					575		
Pro	Met	Gln	Leu	Pro	Tyr	Asp	Ser	Arg	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Gly	
			580					585						590		

Leu	Val	Leu	Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	Val		
		595					600					605					
Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Gly	Leu	Ser	Arg	Ser	Gln	Pro	Val	Met	Lys	Val		
	610					615					620						
Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Pro	Thr	Ala	Arg	Ser	Ser	Glu	Lys	Gln	Ala		
625					630					635					640		
Leu	Met	Ser	Glu	Leu	Lys	Ile	Met	Thr	His	Leu	Gly	Pro	His	Leu	Asn		
				645					650					655			
Ile	Val	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Lys	Ser	Gly	Pro	Ile	Tyr	Ile		
		660						665					670				
Ile	Thr	Glu	Tyr	Cys	Phe	Tyr	Gly	Asp	Leu	Val	Asn	Tyr	Leu	His	Lys		
	675						680					685					
Asn	Arg	Asp	Ser	Phe	Leu	Ser	His	His	Pro	Glu	Lys	Pro	Lys	Lys	Glu		
	690					695					700						
Leu	Asp	Ile	Phe	Gly	Leu	Asn	Pro	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Arg	Ser	Tyr		
705				710						715					720		
Val	Ile	Leu	Ser	Phe	Glu	Asn	Asn	Gly	Asp	Tyr	Met	Asp	Met	Lys	Gln		
				725					730					735			
Ala	Asp	Thr	Thr	Gln	Tyr	Val	Pro	Met	Leu	Glu	Arg	Lys	Glu	Val	Ser		
			740					745					750				
Lys	Tyr	Ser	Asp	Ile	Gln	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Tyr		
	755					760						765					
Lys	Lys	Lys	Ser	Met	Leu	Asp	Ser	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	Leu	Ser	Asp		
	770					775					780						
Asp	Asn	Ser	Glu	Gly	Leu	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Phe	Thr	Tyr		
785				790						795					800		
Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Phe	Leu	Ala	Ser	Lys	Asn	Cys	Val	His		
				805					810					815			
Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Lys	Ile	Val		
			820					825					830				
Lys	Ile	Cys	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	Met	His	Asp	Ser	Asn		
	835					840						845					
Tyr	Val	Ser	Lys	Gly	Ser	Thr	Phe	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro		

850						855										860
Glu	Ser	Ile	Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Thr	Thr	Leu	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	
865					870					875					880	
Tyr	Gly	Ile	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Tyr	
			885						890					895		
Pro	Gly	Met	Met	Val	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Gly	
			900					905					910			
Tyr	Arg	Met	Ala	Lys	Pro	Asp	His	Ala	Thr	Ser	Glu	Val	Tyr	Glu	Ile	
	915						920					925				
Met	Val	Lys	Cys	Trp	Asn	Ser	Glu	Pro	Glu	Lys	Arg	Pro	Ser	Phe	Tyr	
930						935					940					
His	Leu	Ser	Glu	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Pro	Gly	Gln	Tyr	Lys	Lys	
945					950					955					960	
Ser	Tyr	Glu	Lys	Ile	His	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	His	Pro	Ala	
			965					970						975		
Val	Ala	Arg	Met	Arg	Val	Asp	Ser	Asp	Asn	Ala	Tyr	Ile	Gly	Val	Thr	
			980					985					990			
Tyr	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Lys	Leu	Lys	Asp	Trp	Glu	Gly	Gly	Leu	Asp	
	995						1000					1005				
Glu	Gln	Arg	Leu	Ser	Ala	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ile	Ile	Pro	Leu	Pro		
1010						1015					1020					
Asp	Ile	Asp	Pro	Val	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Lys	Arg	Asn		
1025						1030					1035					
Arg	His	Ser	Ser	Gln	Thr	Ser	Glu	Glu	Ser	Ala	Ile	Glu	Thr	Gly		
1040						1045					1050					
Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Arg	Glu	Asp	Glu	Thr	Ile	Glu		
1055						1060					1065					
Asp	Ile	Asp	Met	Met	Asp	Asp	Ile	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser	Asp	Leu		
1070						1075					1080					
Val	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu											
1085																

<210> 7

<211> 1596

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> a human soluble PDGFR-alpha cDNA

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1596)
<223>

<400> 7
atg ggg act tcc cat ccg gcg ttc ctg gtc tta ggc tgt ctt ctc aca 48
Met Gly Thr Ser His Pro Ala Phe Leu Val Leu Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15
ggg ctg agc cta atc ctc tgc cag ctt tca tta ccc tct atc ctt cca 96
Gly Leu Ser Leu Ile Leu Cys Gln Leu Ser Leu Pro Ser Ile Leu Pro
20 25 30
aat gaa aat gaa aag gtt gtg cag ctg aat tca tcc ttt tct ctg aga 144
Asn Glu Asn Glu Lys Val Val Gln Leu Asn Ser Ser Phe Ser Leu Arg
35 40 45
tgc ttt ggg gag agt gaa gtg agc tgg cag tac ccc atg tct gaa gaa 192
Cys Phe Gly Glu Ser Glu Val Ser Trp Gln Tyr Pro Met Ser Glu Glu
50 55 60
gag agc tcc gat gtg gaa atc aga aat gaa gaa aac aac agc ggc ctt 240
Glu Ser Ser Asp Val Glu Ile Arg Asn Glu Glu Asn Asn Ser Gly Leu
65 70 75 80
ttt gtg acg gtc ttg gaa gtg agc agt gcc tcg gcg gcc cac aca ggg 288
Phe Val Thr Val Leu Glu Val Ser Ser Ala Ser Ala Ala His Thr Gly
85 90 95
ttg tac act tgc tat tac aac cac act cag aca gaa gag aat gag ctt 336
Leu Tyr Thr Cys Tyr Tyr Asn His Thr Gln Thr Glu Glu Asn Glu Leu
100 105 110
gaa ggc agg cac att tac atc tat gtg cca gac cca gat gta gcc ttt 384
Glu Gly Arg His Ile Tyr Ile Tyr Val Pro Asp Pro Asp Val Ala Phe
115 120 125
gta cct cta gga atg acg gat tat tta gtc atc gtg gag gat gat gat 432
Val Pro Leu Gly Met Thr Asp Tyr Leu Val Ile Val Glu Asp Asp Asp
130 135 140
tct gcc att ata cct tgt cgc aca act gat ccc gag act cct gta acc 480
Ser Ala Ile Ile Pro Cys Arg Thr Thr Asp Pro Glu Thr Pro Val Thr

145		150		155		160	
tta cac aac agt gag ggg gtg gta cct gcc tcc tac gac agc aga cag	528						
Leu His Asn Ser Glu Gly Val Val Pro Ala Ser Tyr Asp Ser Arg Gln							
		165		170		175	
ggc ttt aat ggg acc ttc act gta ggg ccc tat atc tgt gag gcc acc	576						
Gly Phe Asn Gly Thr Phe Thr Val Gly Pro Tyr Ile Cys Glu Ala Thr							
		180		185		190	
gtc aaa gga aag aag ttc cag acc atc cca ttt aat gtt tat gct tta	624						
Val Lys Gly Lys Lys Phe Gln Thr Ile Pro Phe Asn Val Tyr Ala Leu							
		195		200		205	
aaa gca aca tca gag ctg gat cta gaa atg gaa gct ctt aaa acc gtg	672						
Lys Ala Thr Ser Glu Leu Asp Leu Glu Met Glu Ala Leu Lys Thr Val							
		210		215		220	
tat aag tca ggg gaa acg att gtg gtc acc tgt gct gtt ttt aac aat	720						
Tyr Lys Ser Gly Glu Thr Ile Val Val Thr Cys Ala Val Phe Asn Asn							
		225		230		235	
gag gtg gtt gac ctt caa tgg act tac cct gga gaa gtg aaa ggc aaa	768						
Glu Val Val Asp Leu Gln Trp Thr Tyr Pro Gly Glu Val Lys Gly Lys							
		245		250		255	
ggc atc aca atg ctg gaa gaa atc aaa gtc cca tcc atc aaa ttg gtg	816						
Gly Ile Thr Met Leu Glu Glu Ile Lys Val Pro Ser Ile Lys Leu Val							
		260		265		270	
tac act ttg acg gtc ccc gag gcc acg gtg aaa gac agt gga gat tac	864						
Tyr Thr Leu Thr Val Pro Glu Ala Thr Val Lys Asp Ser Gly Asp Tyr							
		275		280		285	
gaa tgt gct gcc cgc cag gct acc agg gag gtc aaa gaa atg aag aaa	912						
Glu Cys Ala Ala Arg Gln Ala Thr Arg Glu Val Lys Glu Met Lys Lys							
		290		295		300	
gtc act att tct gtc cat gag aaa ggt ttc att gaa atc aaa ccc acc	960						
Val Thr Ile Ser Val His Glu Lys Gly Phe Ile Glu Ile Lys Pro Thr							
		305		310		315	
ttc agc cag ttg gaa gct gtc aac ctg cat gaa gtc aaa cat ttt gtt	1008						
Phe Ser Gln Leu Glu Ala Val Asn Leu His Glu Val Lys His Phe Val							
		325		330		335	
gta gag gtg cgg gcc tac cca cct ccc agg ata tcc tgg ctg aaa aac	1056						
Val Glu Val Arg Ala Tyr Pro Pro Pro Arg Ile Ser Trp Leu Lys Asn							
		340		345		350	

aat	ctg	act	ctg	att	gaa	aat	ctc	act	gag	atc	acc	act	gat	gtg	gaa	1104
Asn	Leu	Thr	Leu	Ile	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Thr	Asp	Val	Glu	
		355					360					365				
aag	att	cag	gaa	ata	agg	tat	cga	agc	aaa	tta	aag	ctg	atc	cgt	gct	1152
Lys	Ile	Gln	Glu	Ile	Arg	Tyr	Arg	Ser	Lys	Leu	Lys	Leu	Ile	Arg	Ala	
	370					375					380					
aag	gaa	gaa	gac	agt	ggc	cat	tat	act	att	gta	gct	caa	aat	gaa	gat	1200
Lys	Glu	Glu	Asp	Ser	Gly	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Ala	Gln	Asn	Glu	Asp	
385					390					395					400	
gct	gtg	aag	agc	tat	act	ttt	gaa	ctg	tta	act	caa	gtt	cct	tca	tcc	1248
Ala	Val	Lys	Ser	Tyr	Thr	Phe	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Ser	Ser	
				405					410					415		
att	ctg	gac	ttg	gtc	gat	gat	cac	cat	ggc	tca	act	ggg	gga	cag	acg	1296
Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Asp	His	His	Gly	Ser	Thr	Gly	Gly	Gln	Thr	
			420					425					430			
gtg	agg	tgc	aca	gct	gaa	ggc	acg	ccg	ctt	cct	gat	att	gag	tgg	atg	1344
Val	Arg	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Pro	Leu	Pro	Asp	Ile	Glu	Trp	Met	
		435					440					445				
ata	tgc	aaa	gat	att	aag	aaa	tgt	aat	aat	gaa	act	tcc	tgg	act	att	1392
Ile	Cys	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Cys	Asn	Asn	Glu	Thr	Ser	Trp	Thr	Ile	
	450					455					460					
ttg	gcc	aac	aat	gtc	tca	aac	atc	atc	acg	gag	atc	cac	tcc	cga	gac	1440
Leu	Ala	Asn	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Ile	Thr	Glu	Ile	His	Ser	Arg	Asp	
465					470					475					480	
agg	agt	acc	gtg	gag	ggc	cgt	gtg	act	ttc	gcc	aaa	gtg	gag	gag	acc	1488
Arg	Ser	Thr	Val	Glu	Gly	Arg	Val	Thr	Phe	Ala	Lys	Val	Glu	Glu	Thr	
				485					490					495		
atc	gcc	gtg	cga	tgc	ctg	gct	aag	aat	ctc	ctt	gga	gct	gag	aac	cga	1536
Ile	Ala	Val	Arg	Cys	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Glu	Asn	Arg	
			500					505					510			
gag	ctg	aag	ctg	gtg	gct	ccc	acc	ctg	cgt	tct	gaa	gac	tac	aag	gac	1584
Glu	Leu	Lys	Leu	Val	Ala	Pro	Thr	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Tyr	Lys	Asp	
		515					520					525				
gac	gat	gac	aag													1596
Asp	Asp	Asp	Lys													
		530														

<211> 532
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> a human soluble PDGFR-alpha

<400> 8

Met	Gly	Thr	Ser	His	Pro	Ala	Phe	Leu	Val	Leu	Gly	Cys	Leu	Leu	Thr	
1				5				10						15		
Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Cys	Gln	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	
			20					25					30			
Asn	Glu	Asn	Glu	Lys	Val	Val	Gln	Leu	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Leu	Arg	
		35					40					45				
Cys	Phe	Gly	Glu	Ser	Glu	Val	Ser	Trp	Gln	Tyr	Pro	Met	Ser	Glu	Glu	
	50					55					60					
Glu	Ser	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Arg	Asn	Glu	Glu	Asn	Asn	Ser	Gly	Leu	
65				70						75					80	
Phe	Val	Thr	Val	Leu	Glu	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	His	Thr	Gly	
				85					90					95		
Leu	Tyr	Thr	Cys	Tyr	Tyr	Asn	His	Thr	Gln	Thr	Glu	Glu	Asn	Glu	Leu	
			100					105					110			
Glu	Gly	Arg	His	Ile	Tyr	Ile	Tyr	Val	Pro	Asp	Pro	Asp	Val	Ala	Phe	
		115					120					125				
Val	Pro	Leu	Gly	Met	Thr	Asp	Tyr	Leu	Val	Ile	Val	Glu	Asp	Asp	Asp	
	130					135					140					
Ser	Ala	Ile	Ile	Pro	Cys	Arg	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Thr	
145				150					155						160	
Leu	His	Asn	Ser	Glu	Gly	Val	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asp	Ser	Arg	Gln	
				165				170						175		
Gly	Phe	Asn	Gly	Thr	Phe	Thr	Val	Gly	Pro	Tyr	Ile	Cys	Glu	Ala	Thr	
			180					185					190			
Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	Gln	Thr	Ile	Pro	Phe	Asn	Val	Tyr	Ala	Leu	
		195					200					205				
Lys	Ala	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Leu	Glu	Met	Glu	Ala	Leu	Lys	Thr	Val	
	210					215					220					

Tyr	Lys	Ser	Gly	Glu	Thr	Ile	Val	Val	Thr	Cys	Ala	Val	Phe	Asn	Asn	
225					230					235					240	
Glu	Val	Val	Asp	Leu	Gln	Trp	Thr	Tyr	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Gly	Lys	
				245					250					255		
Gly	Ile	Thr	Met	Leu	Glu	Glu	Ile	Lys	Val	Pro	Ser	Ile	Lys	Leu	Val	
			260					265					270			
Tyr	Thr	Leu	Thr	Val	Pro	Glu	Ala	Thr	Val	Lys	Asp	Ser	Gly	Asp	Tyr	
		275					280					285				
Glu	Cys	Ala	Ala	Arg	Gln	Ala	Thr	Arg	Glu	Val	Lys	Glu	Met	Lys	Lys	
	290					295					300					
Val	Thr	Ile	Ser	Val	His	Glu	Lys	Gly	Phe	Ile	Glu	Ile	Lys	Pro	Thr	
305					310					315					320	
Phe	Ser	Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Leu	His	Glu	Val	Lys	His	Phe	Val	
				325					330					335		
Val	Glu	Val	Arg	Ala	Tyr	Pro	Pro	Pro	Arg	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	
			340					345					350			
Asn	Leu	Thr	Leu	Ile	Glu	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Thr	Asp	Val	Glu	
		355					360					365				
Lys	Ile	Gln	Glu	Ile	Arg	Tyr	Arg	Ser	Lys	Leu	Lys	Leu	Ile	Arg	Ala	
	370					375					380					
Lys	Glu	Glu	Asp	Ser	Gly	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Ala	Gln	Asn	Glu	Asp	
385					390					395					400	
Ala	Val	Lys	Ser	Tyr	Thr	Phe	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Ser	Ser	
				405					410					415		
Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Asp	His	His	Gly	Ser	Thr	Gly	Gly	Gln	Thr	
			420					425					430			
Val	Arg	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr	Pro	Leu	Pro	Asp	Ile	Glu	Trp	Met	
		435					440					445				
Ile	Cys	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Cys	Asn	Asn	Glu	Thr	Ser	Trp	Thr	Ile	
	450					455					460					
Leu	Ala	Asn	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Ile	Thr	Glu	Ile	His	Ser	Arg	Asp	
465					470					475					480	
Arg	Ser	Thr	Val	Glu	Gly	Arg	Val	Thr	Phe	Ala	Lys	Val	Glu	Glu	Thr	
				485					490					495		

Ile Ala Val Arg Cys Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gly Ala Glu Asn Arg
500 505 510

Glu Leu Lys Leu Val Ala Pro Thr Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Lys Asp
515 520 525

Asp Asp Asp Lys
530

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 9
aaagatctat ggggacttcc catccggc 28

<210> 10
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 10
ttgctagctc acttgtcate gtcgtccttg tagtccttcag aacgcagggt 50

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 11
gcaggctgct gtaacgatga a 21

<210> 12
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 12

tcacatctgc tgtgctgtag ga

22

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 13

catgcagatc atgcggatca aacctc

26

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 14

cagcaataacc atttggaatg gaat

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized sequence

<400> 15

ttgaagtctt cgggagtgat atca

24

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 16
cg ttggg att cgcag tacc c tcaca 25

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 17
cg tca agtgc cagcct tca 19

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 18
atgcac actc caggtgttcc t 21

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 19
cactttggcc accttgacac tgcg 24

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 20
gagcatcttc gacaacctct acac 24

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 21
ccggtatcca ctcttgatct tattg 25

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 22
ccctatcctg gcatgatggc cgattct 27

<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 23
cctggagaaa cctgccaaagt at 22

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 24

ttgaagtcgc aggagacaac ct 22

<210> 25
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 25
tgcctgcttc accaccttct tgatgt 26

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 26
aagaattcat gaggaccttg gcttgccctgc 30

<210> 27
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 27
aagaattcctt aggtggggttt taaccttttt ctttt 35

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

<400> 28
tccacgccac taagcatgtg 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

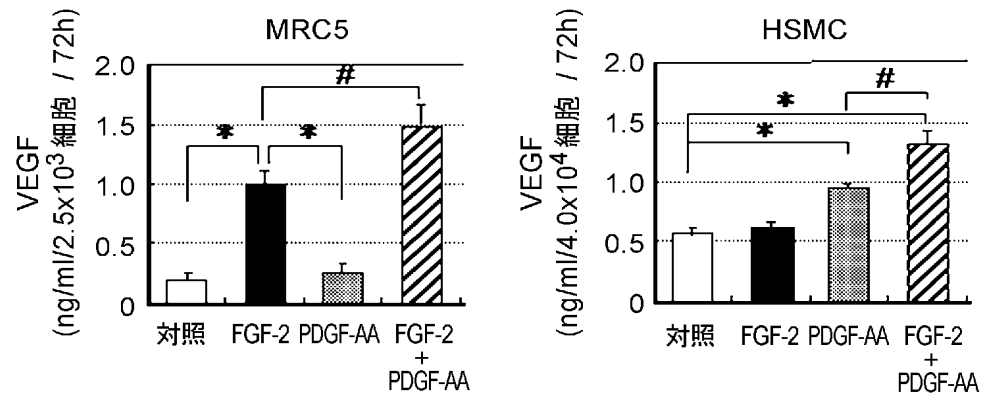
<400> 29
tcgacctgac tccgaggaat 20

<210> 30
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized sequence

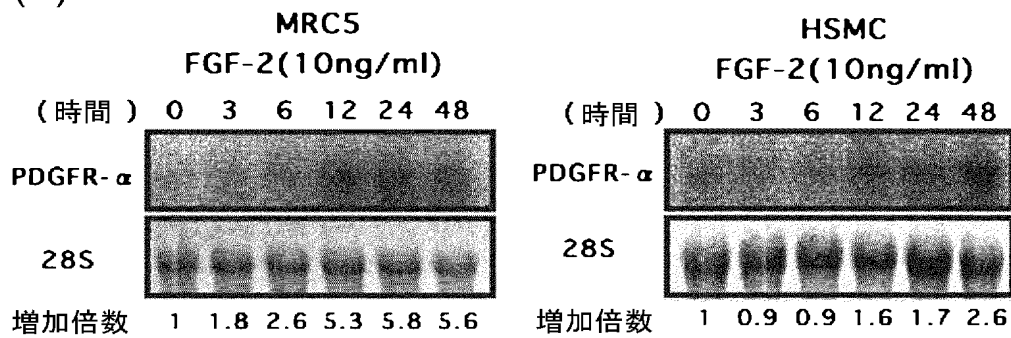
<400> 30
ctgcaagacc aggacggtea tttaga 27

(A)

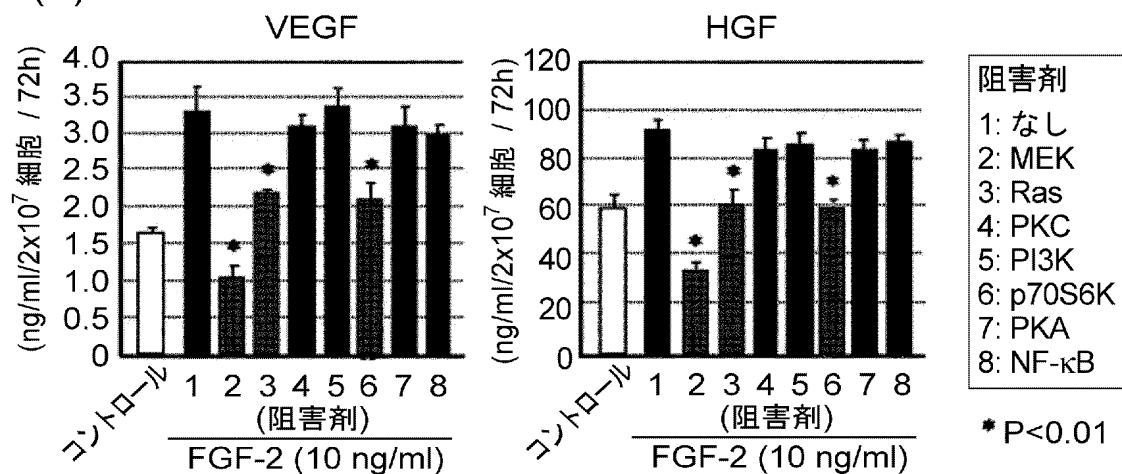


*P<0.01, #P<0.05

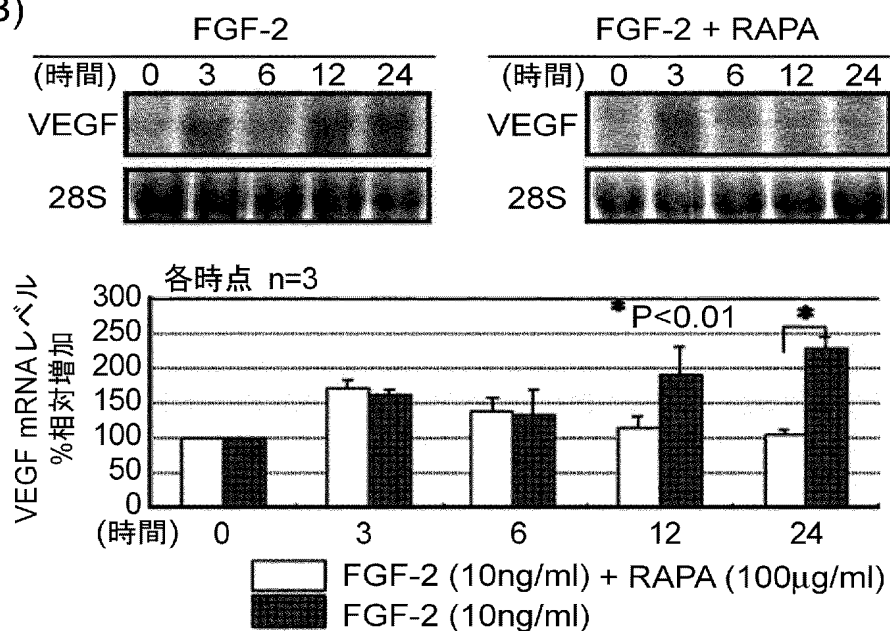
(B)



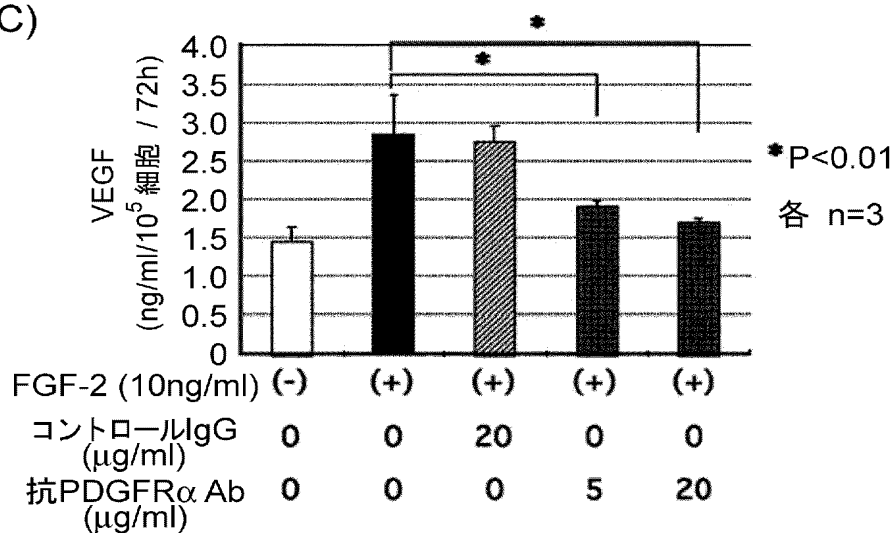
(A)



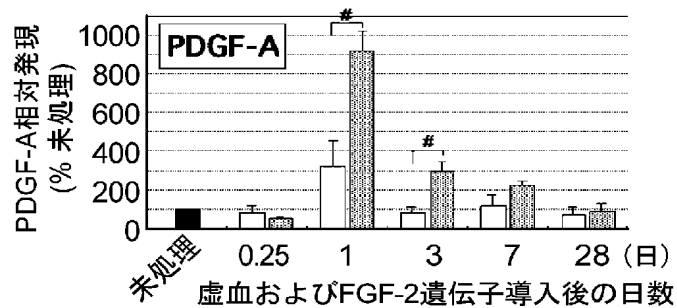
(B)



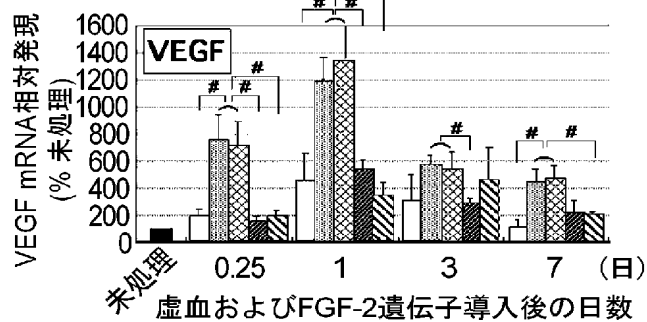
(C)



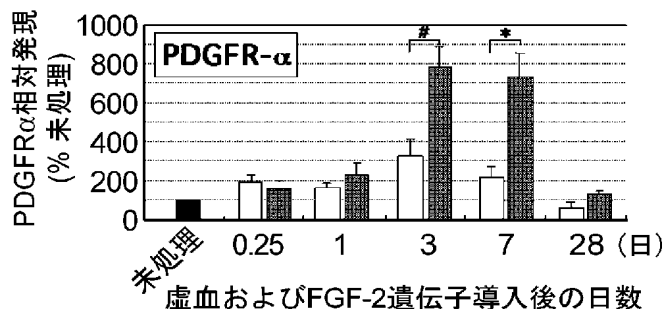
(A)



(C)

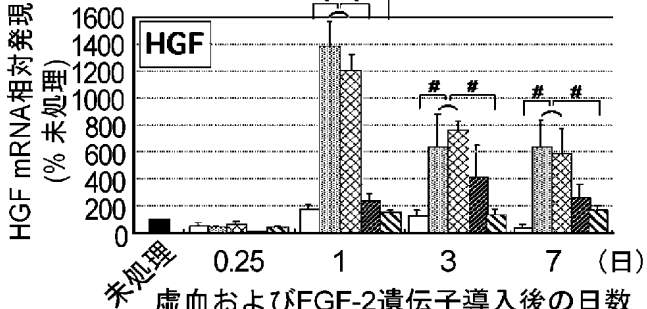


(B)



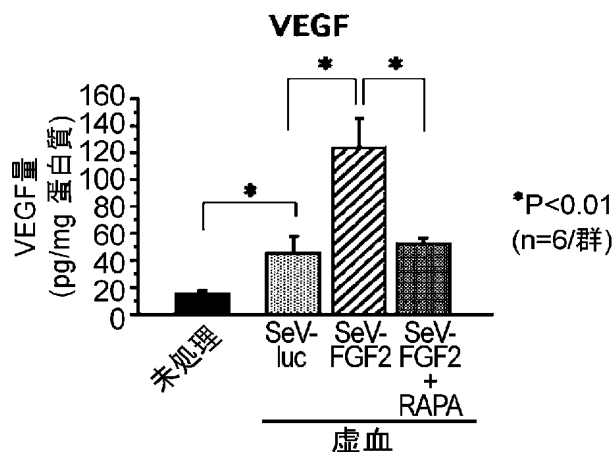
#P<0.05
*P<0.01

(D)



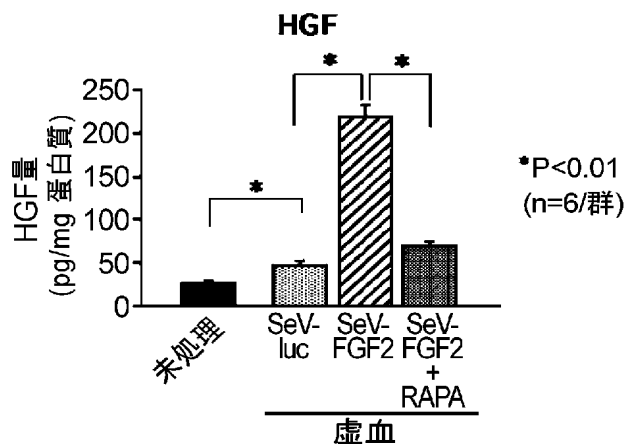
#P<0.05
*P<0.01

(E)



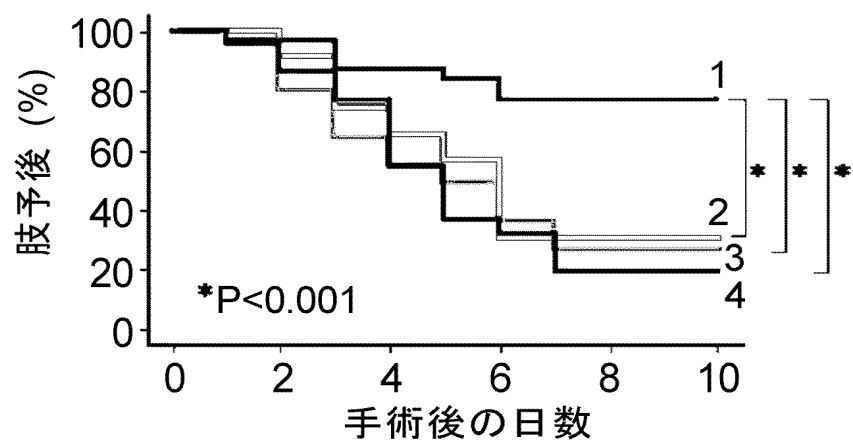
*P<0.01
(n=6/群)

(F)

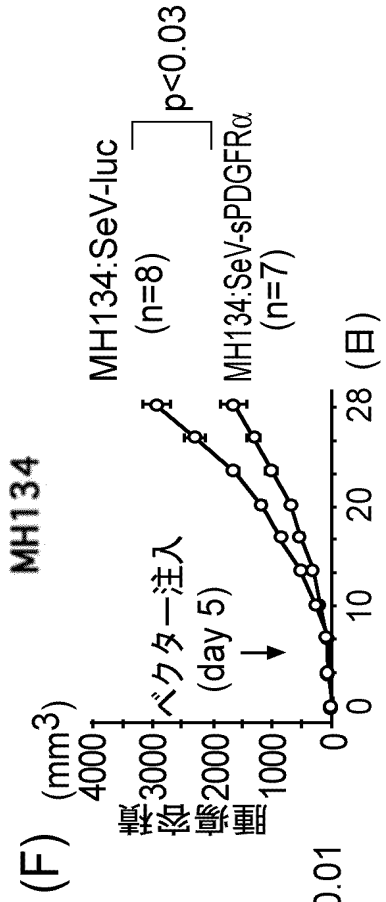
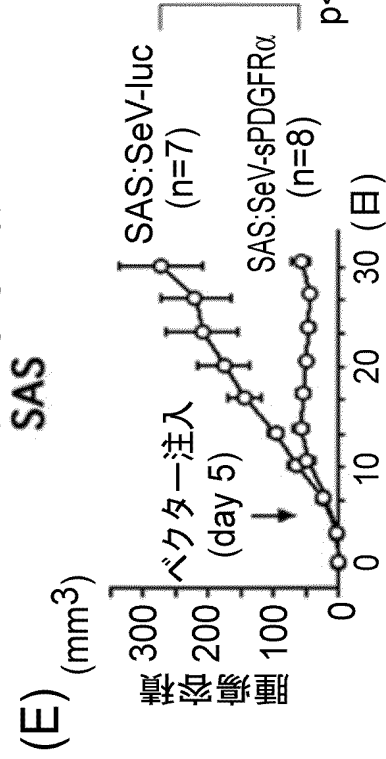
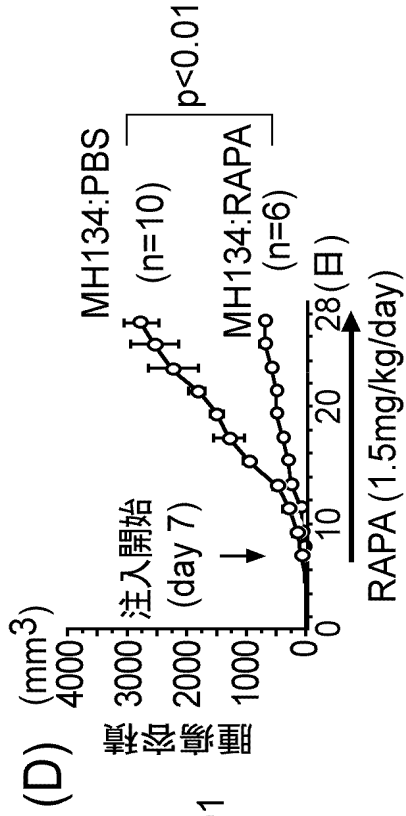
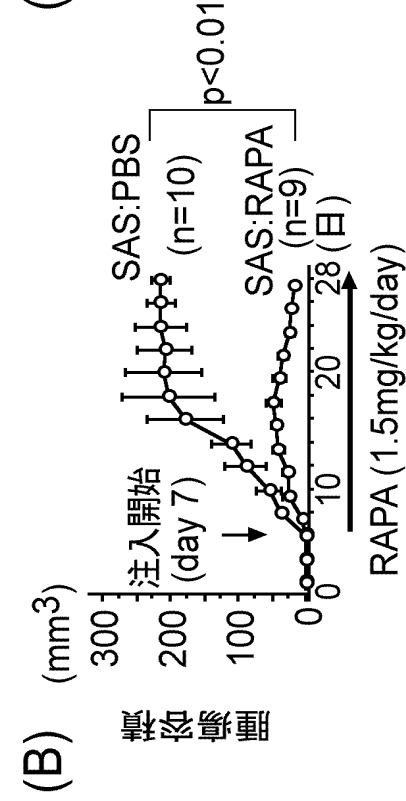
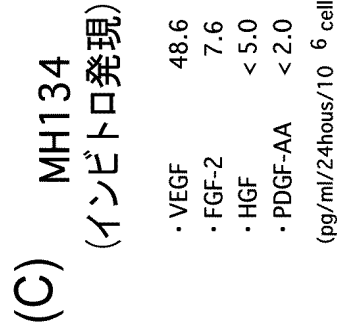
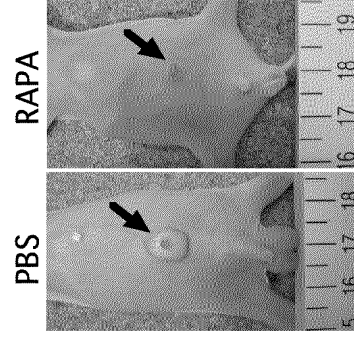
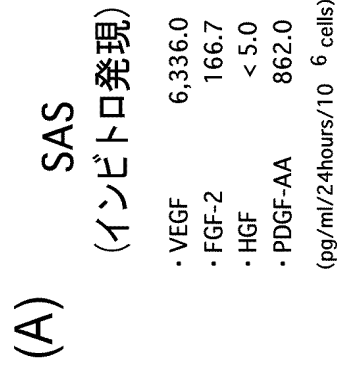


*P<0.01
(n=6/群)

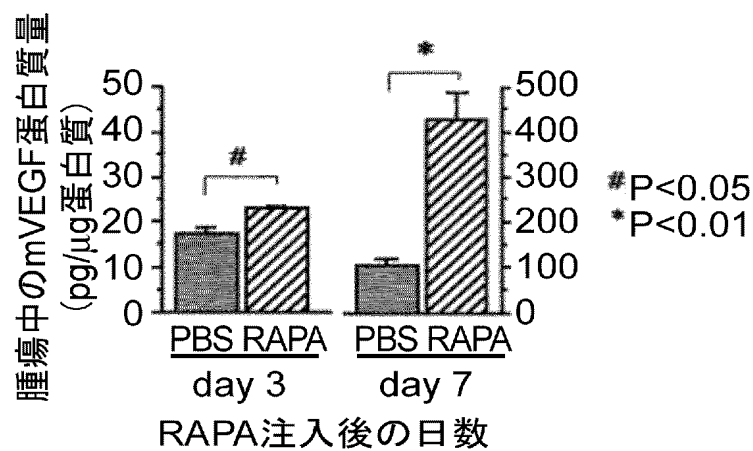
【図 4】



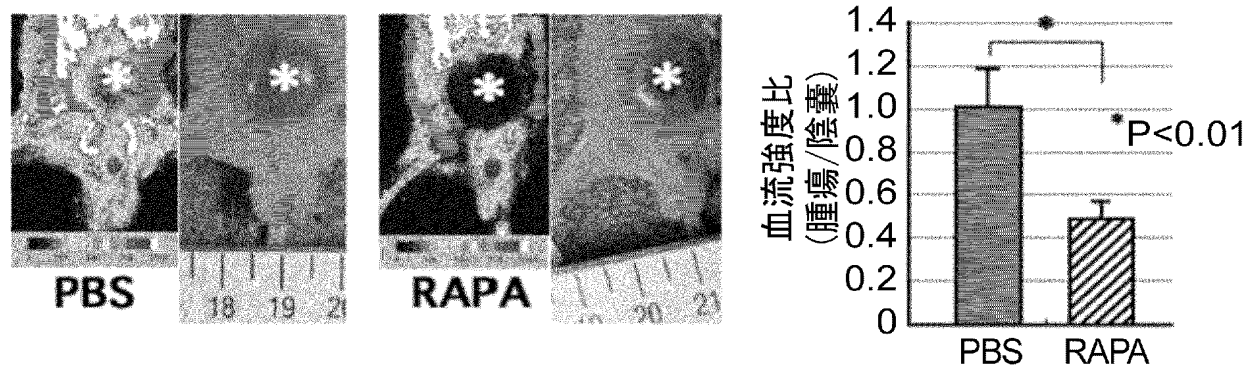
- | | | |
|---|---|------------------------------|
| 1 | — | SeV-FGF2 + コントロールAb (n=8) |
| 2 | — | SeV-FGF2 + 抗PDGF-AA Ab (n=9) |
| 3 | — | SeV-FGF2 + RAPA (n=8) |
| 4 | — | SeV-luciferase (n=8) |



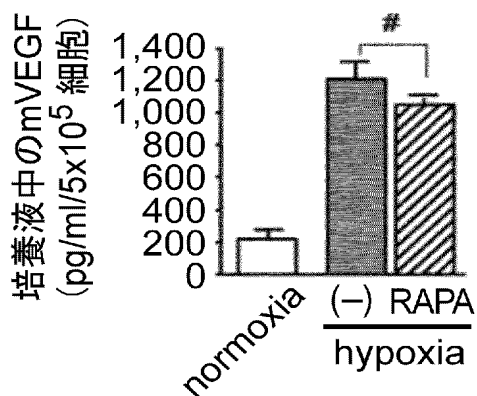
(A)



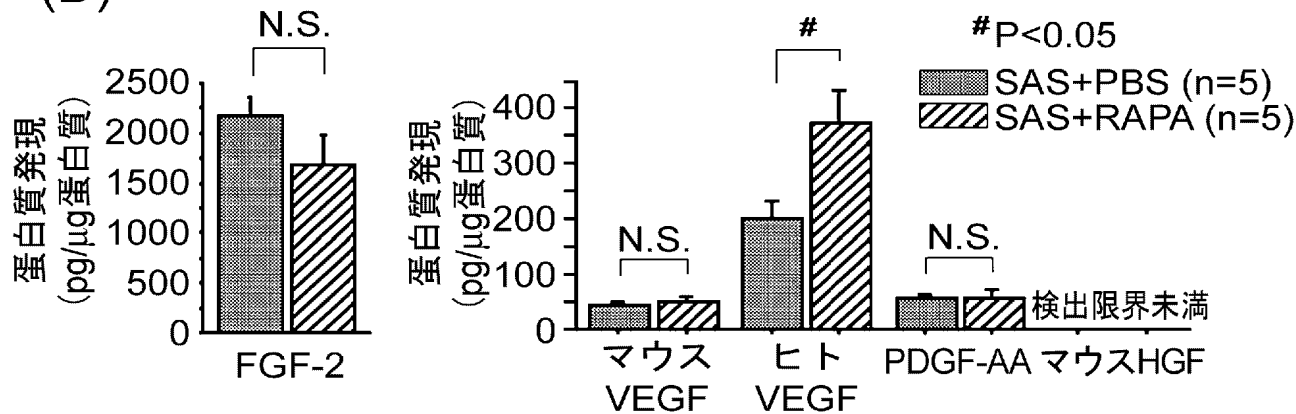
(B)



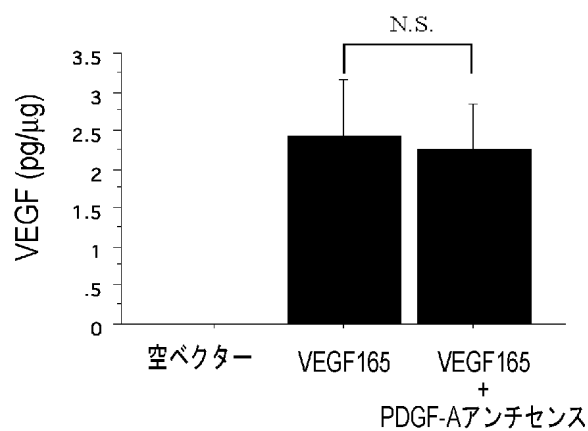
(C)



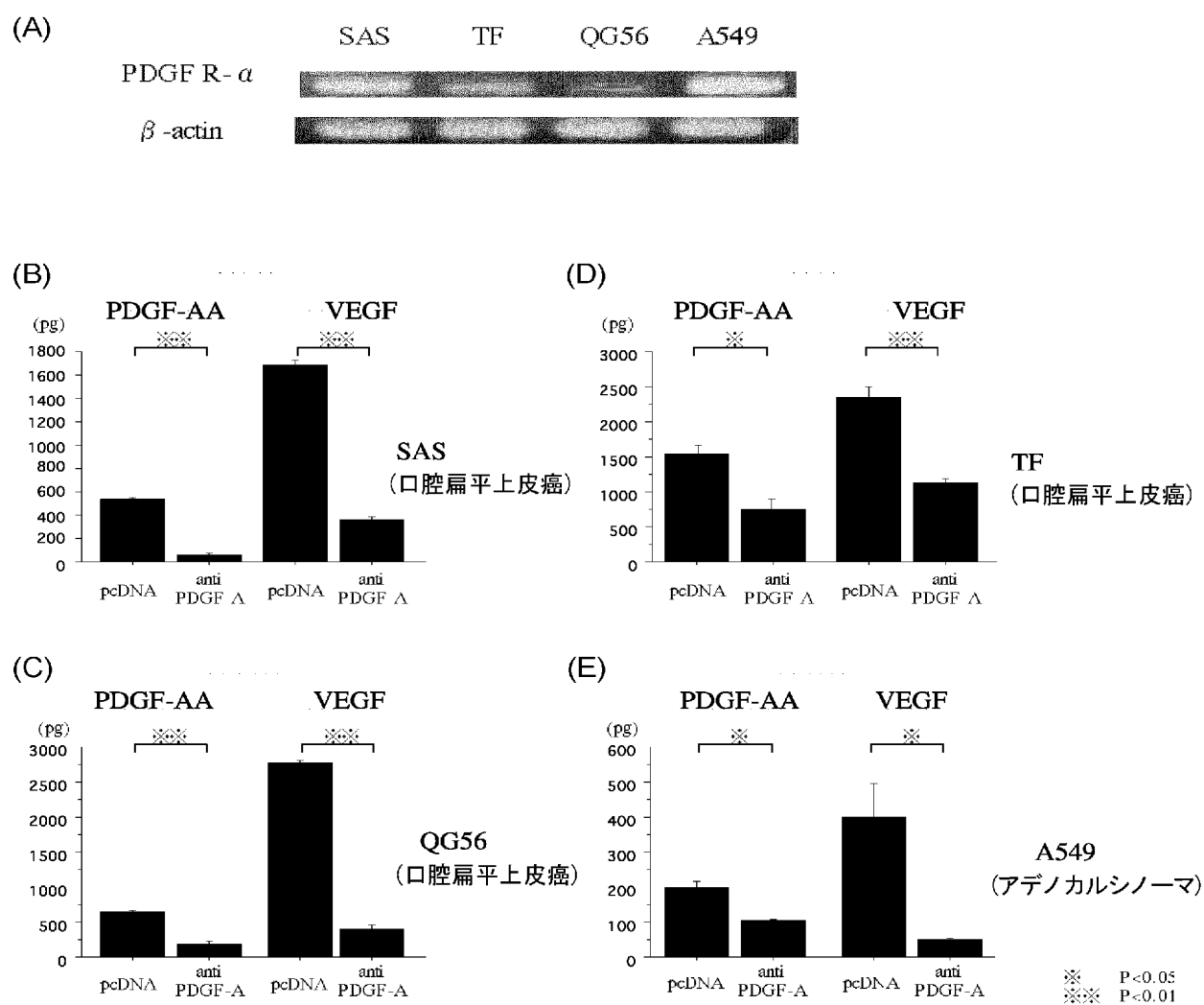
(D)

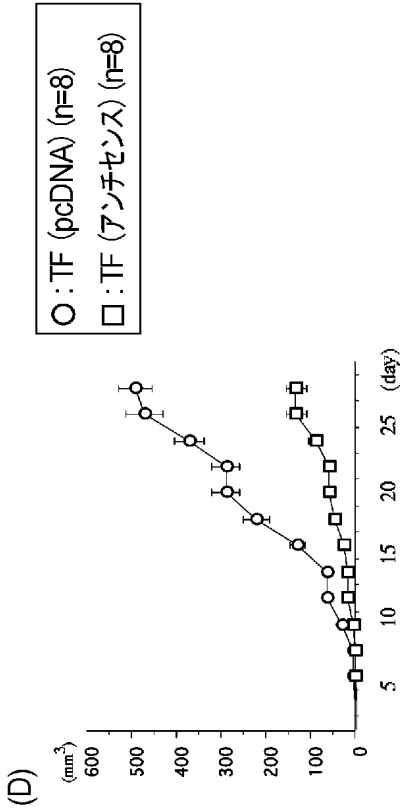
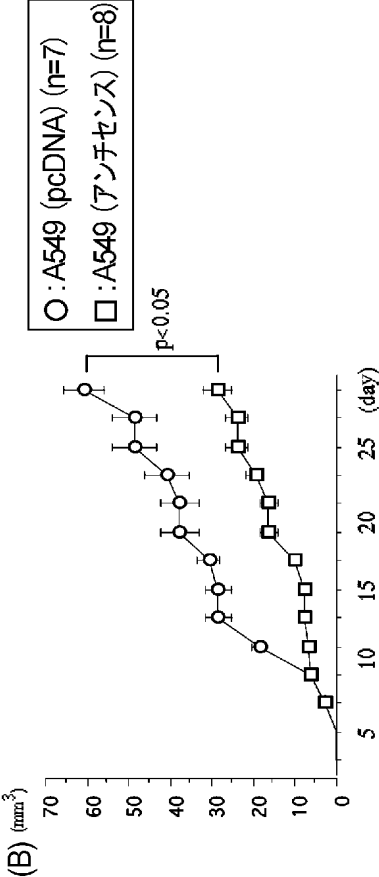
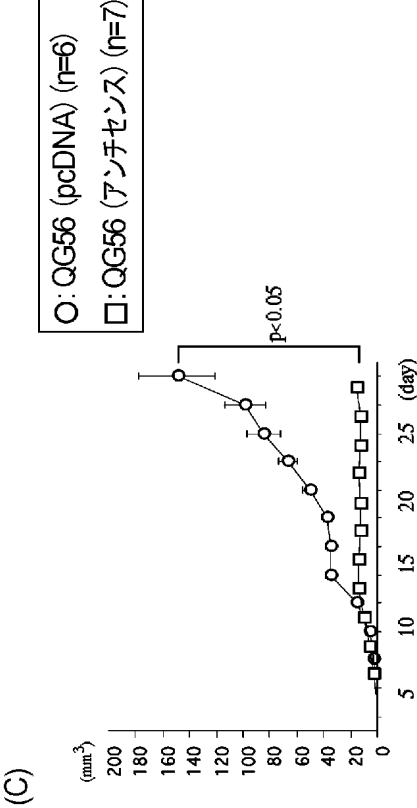
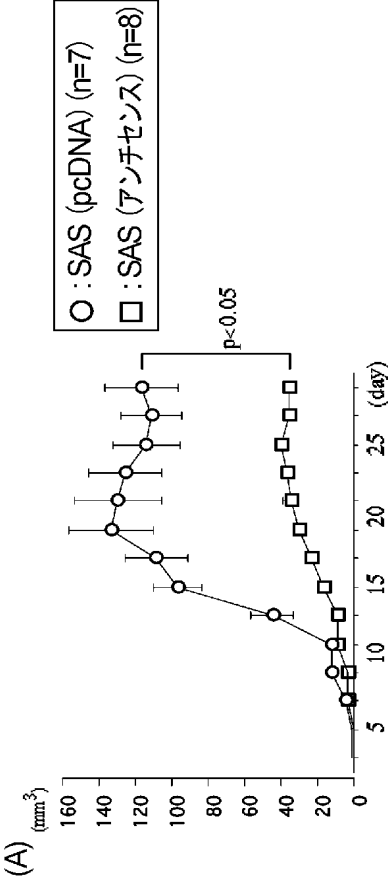


【図 7】

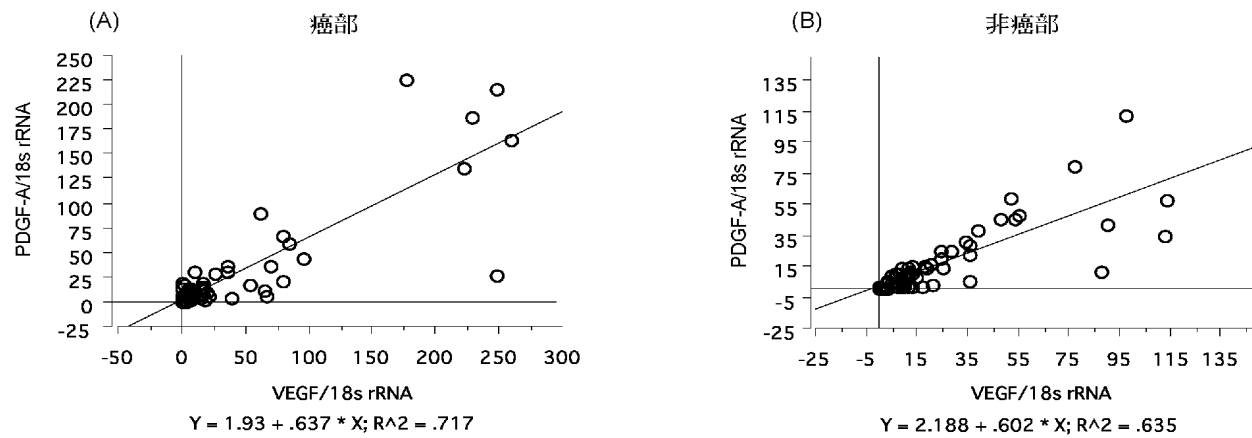


【図 8】

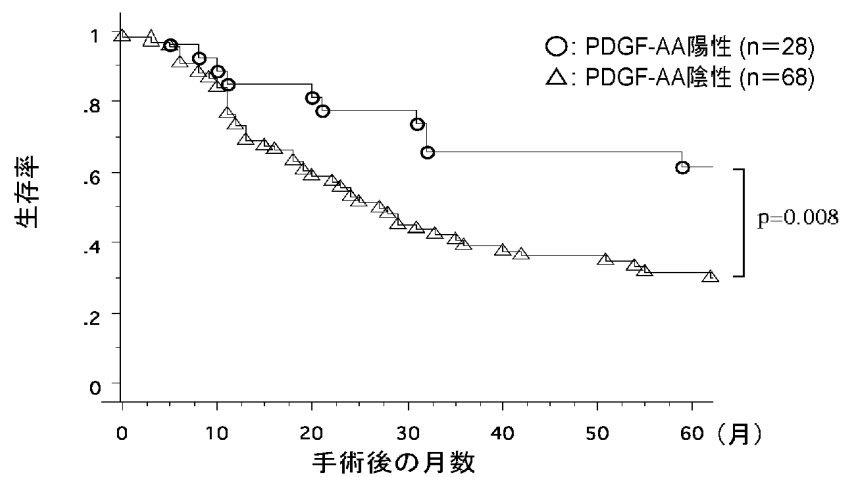




【図 1 0】



【図 1 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、腫瘍の増殖を抑制する方法を提供する。

【解決手段】 本発明は、PDGF-Aの発現またはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害する工程を含む、腫瘍増殖を抑制する方法を提供する。PDGF-AAによるPDGFR α -p70S6Kシグナル伝達経路の活性化は、腫瘍血管形成の重要なファクターであり腫瘍を患う患者の予後と関連している。腫瘍またはその周辺組織におけるPDGF-Aの発現を阻害することによって、あるいはPDGF-AホモダイマーとPDGFR α との結合を阻害することによって、腫瘍における血管系の形成および維持を阻害し、これにより腫瘍の増殖を抑制することができる。

【選択図】 なし

出願人履歴

5 9 5 1 5 5 1 0 7

19951101

新規登録

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

株式会社ダイナベック研究所